

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lenka Svitáková

Endocytóza u rostlin

Endocytosis in plants

Bakalářská práce

Školitelka: **RNDr. Jana Krtková, Ph.D.**

Konzultantka: **RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.**

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4.8.2018

Podpis

Poděkování

Mé poděkování patří školitelce RNDr. Janě Krtkové, Ph.D. za vstřícnost, ochotu při konzultacích, trpělivost a cenné rady během psaní bakalářské práce. Poděkovat bych chtěla také za konzultace RNDr. Kateřině Schwarzerové, Ph.D., během kterých jsem obdržela dobré připomínky a nápady pro psaní textu.

Abstrakt

Endocytóza je proces typický pro eukaryotické buňky. Jedná se o proces pučení plasmatické membrány, při kterém dochází k vytvoření membránového váčku se specificky selektovaným nákladem. Váček je následně pohlcen buňkou. Endocytóza má zásadní vliv na růst a vývoj rostlin, a to nejen příjmem živin z extracelulárního prostoru, ale i změnou lipidového složení membrán, které zásadně ovlivňuje buněčnou signalizaci.

U rostlin je známo několik typů endocytózy, liší se od sebe proteinovým aparátem, který se na jejich průběhu podílí. Nejprostudovanějším typem endocytózy u rostlin je endocytóza zprostředkovaná klatrinem. Ta probíhá v pěti na sebe navazujících krocích, o kterých se u rostlin ví prozatím méně detailů než u živočišných buněk. V první části své práce popisují dosavadní poznatky o průběhu endocytózy zprostředkované klatrinem a o hráčích, které se na ní v rostlinách podílejí. Zmiňují také způsoby, kterými umí rostlinná buňka proces endocytózy regulovat.

V závěrečné části své práce shrnují poznatky o dalších, recentně objevených a prozatím neprobádaných typech endocytózy, které jsou nezávislé na klatrinu. Detaily těchto endocytických cest nejsou prozatím známy. Jsou jimi endocytóza spojená s membránovými mikrodomény a fluid-phase endocytóza. Další zkoumání by mohlo napomoci porozumění tomu, jaký mají průběh a k čemu je rostlina využívá.

Klíčová slova:

endocytóza, klatrin, plasmatická membrána, klatrinem zprostředkovaná endocytóza, regulace endocytózy, fluid-phase endocytóza, rostlinná buňka

Abstract

Endocytosis is a process typical for eukaryotic cells. It is a mechanism that ensures invagination of the plasma membrane which leads to the creation of a membrane vesicle with specifically selected cargo. The vesicle is then internalized by the cell. Endocytosis has a crucial role in plant growth and development not only thanks to the reception of nutrients from the extracellular space but also by having a huge impact on the membrane composition which influences cellular signalling.

There are few types of endocytosis known in plants. They differ from each other by the molecular machinery which ensures their process. The most studied type in plants is the clathrin-mediated endocytosis. Clathrin-coated vesicle formation proceeds through five stages. However, there are less details known about it in plant cells than in animal cells. In the first part of my bachelor thesis I describe recent knowledge of this topic and the most important participants in this process. I also mention the mechanisms of regulations that plant cells use to coordinate clathrin-mediated endocytosis.

In the second part I summarize recently discovered types of endocytosis in plants that are independent from clathrin. These are endocytosis associated with microdomains and fluid-phase endocytosis. The details of these endocytic ways are still unclear. Future experiments are needed for better understanding of the way they proceed and what they can be used in plants for.

Key words

endocytosis, clathrin, plasma membrane, clathrin-mediated endocytosis, regulation of endocytosis, fluid-phase endocytosis, plant cell

Seznam použitých zkratek

AA – amino acid

ABP1 – AUXIN BINDING PROTEIN 1

AGD3 – ARF-GAP domain protein 3

AL1 – AUXILIN-LIKE 1

AL2 – AUXILIN-LIKE 2

AMT1 – ammonium transporter 1

AP – adaptor protein

Arf – ADP-ribosylation factor

At – *Arabidopsis thaliana*

BAR - Bin/amphiphysin/Rvs domain

BFA – Brefeldin A

BOR1 – boron receptor 1

BRI1 – brassinosteroid insensitive 1

CCPs – clathrin coated pits

CCV – clathrin coated vesicles

CHC – clathrin heavy chain

CIE – clathrin independent endocytosis

CLC – clathrin light chain

CME – clathrin mediated endocytosis

COPI – coat protein complex I

COPII – coat protein complex II

DUBs – deubiquitinases

DRPs – dynamin related proteins

ECA1 – Epsin-like clathrin adaptor 1

ECA2 – Epsin-like clathrin adaptor 2

ECA4 – Epsin-like clathrin adaptor 4

EE – early endosome

ER – endoplasmic reticulum

ESCRT – endosomal sorting complex required for transport

FCHo – Fer/Cip4 homolog domain

FPE – fluid-phase endocytosis

GAP – GTPase activating protein

GED – GTPase effector domain
GEF – guanine exchange factor
GDP – guanosine diphosphate
GNL1 – GNOM-LIKE 1
GTP – guanosine triphosphate
HSC70 – heat shock cognate 70
ILVs – intraluminal vesicles
KAT1 – potassium (K⁺) channel
K63 – lysine 63
LE – late endosome
PH – pleckstrin homology domain
PI – phosphatidylinositol
PIN – PIN-FORMED
PIP2 – phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI4P – phosphatidylinositol 4-phosphate
PM – plasma membrane
PRD – proline rich domain
PSV – protein storage vacuole
ROP – Rho-like GTPase of plants
SA – salicylic acid
Sar1 – Secretion-associated Ras-related protein 1
SFC – SCARFACE
SH3 – Src homology 3 domain
SL –strigolactone
SNARE – soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
TGN – *trans*-Golgi network
TOL – TARGET OF RAPAMYCIN LIKE
TPC – TPLATE complex
VAN3 – VASCULAR NETWORK DEFECTIVE 3

Obsah

1. Úvod	1
2. Klatrinem zprostředkovaná endocytóza	2
2.1. Význam a průběh tvorby klatrinem obalených váčků	2
2.2. Proteiny, které se podílejí na CME	4
2.2.1. Adaptorové proteinové komplexy	4
2.2.1. Monomerické adaptory	8
2.2.2. Klatrin	8
2.2.3. Dynamin a DRPs	10
2.2.4. Cytoskelet	12
2.3. Regulace CME	13
2.3.1. Malé GTPázy	13
2.3.2. Hormony	16
2.3.3. Složení membrány	17
2.3.4. Ubikvitinace	18
2.3.5. Další regulace CME	19
3. Endocytóza nezávislá na klatrinu	20
3.1. Fluid-phase endocytóza	20
3.2. Endocytóza spojená s membránovými mikrodomény	20
4. Závěr	22
5. Dodatky	23
5.1. Další obalené váčky v rostlinné buňce	23
5.1.1. COPI váčky	23
5.1.2. COPII váčky	23
6. Seznam použité literatury	25

1. Úvod

Endocytóza je evolučně konzervovaný proces typický pro všechny eukaryotické buňky. Představuje hlavní cestu pro vstup membránových proteinů a lipidů, extracelulárních molekul a některých živin do buňky. Tento proces je pro buňky klíčovým mechanismem pro vývoj, růst, signalizaci a obranné mechanismy. Pro přežití buňky je zásadní neustálá regulace složení obsahu proteinů a lipidů na plazmatické membráně (PM). Cyklování podléhají hlavně různé receptory, transportéry a enzymy zprostředkovávající tvorbu buněčné stěny. Tyto jsou selektivně nakládány do pučícího váčku a endocytózou jsou pohlcovány. Je to přísně regulovaný proces vyžadující interakce na úrovni proteinů a lipidů (McMahon and Boucrot, 2011).

Endocytóza byla poprvé objevena v živočišných buňkách a po dlouhou dobu převládal názor, že u rostlin podobný proces existovat nemůže z důvodu přítomnosti turgoru (Cram W. J., 1980). Později se však objevovaly důkazy o existenci endocytózy i u rostlin (Robinson and Milliner, 1990). V současné době je u rostlin známých několik endocytických cest. Každá endocytická cesta využívá molekulární aparát specifický pro daný typ endocytózy. Obecně se rozlišuje endocytóza zprostředkovaná klatrinem (CME – clathrin mediated endocytosis) a endocytóza nezávislá na klatrinu (CIE – clathrin independent endocytosis). CME je zdaleka nejlépe probádaným typem endocytózy u rostlin, proto se jí budu věnovat nejvíce a podrobně představím molekulární aparát podílející se na jejím průběhu a regulaci (2.1, 2.3). O CIE existují prozatím pouze útržkovité informace. U živočišných buněk je známo více druhů CIE (Ferreira and Boucrot, 2018). Jedním z důvodů je, že živočišná buňka nemá buněčnou stěnu, která by ji mohla omezovat ve změně tvaru povrchu buňky. U rostlin jsou známy dva typy CIE: fluid-phase endocytóza (FPE – fluid-phase endocytosis) a endocytóza spojená s membránovými mikrodomény. Těm se budu krátce věnovat v závěrečné části své práce (viz kapitola 3).

2. Klatrinem zprostředkovaná endocytóza

2.1. Význam a průběh tvorby klatrinem obalených váčků

CME je nejprobádanějším typem endocytózy u rostlin. Během endocytózy dochází k postupné invaginaci PM a tím k vytvoření klatrinem obalených váčků (CCV – clathrin coated vesicles). U rostlin bývají menší než u živočichů, o průměru ~35-60 nm (McMahon and Boucrot, 2011). K vytvoření váčku dojde kooperací mnoha proteinů. Tento evolučně konzervovaný proces je spojený s internalizací membránových proteinů a extracelulárních látek pomocí tohoto váčku. CCV se netvoří pouze na PM, ale jsou zodpovědné i za dopravu post-Golgi váčků. To zahrnuje pozdní sekretorické dráhy z *trans*-Golgi sítě (TGN – *trans*-Golgi network) na PM a vakuolární transport z TGN do vakuoly. CCV zajišťují také transport materiálu ke vznikající buněčné desce během dělení buňky a také k recyklaci přebytečného materiálu ze vznikající buněčné desky (Bednarek and Backues, 2010; Paez Valencia et al., 2016). Molekulární aparát pro tvorbu CCV se pro každý kompartment může v některých proteinech lišit. Ve své práci se zaměřím převážně na hráče ve tvorbě CCV na PM (viz kapitola 2.2).

Než se budu podrobněji věnovat proteinům účastnícím se v procesu CME, ráda bych nastínila, jakým způsobem je dáno CCV v buňce vzniknout. Aby se takový váček z membrány utvořil, je potřeba molekulárního aparátu, který zprostředkuje jednotlivé kroky tvorby. CME probíhá v pěti po sobě jdoucích a částečně se překrývajících krocích. Prvním je iniciace, kdy dojde k nahloučení adaptorových proteinů [u rostlin hlavně AP-2 a TPLATE komplex (TPC – TPLATE complex)] na PM v místě budoucího pučení váčku. Tím dojde i k mírnému vyklenutí PM do cytosolu (McMahon and Boucrot, 2011). Mírné vyboulení membrány může již předtím způsobovat shlukování membránových proteinů do klastrů v rámci membrány daného kompartmentu. Shlukovat se mohou (trans)membránové receptory, enzymy, transportéry, které často spolupracují na nějaké společné funkci (Werlen and Palmer, 2002). Druhým krokem je výběr nákladu. Ten je zprostředkován adaptorovými proteiny, které se vážou na specifické motivy cytosolické části (trans)membránových proteinů určených k naložení. Doplňkové adaptorové proteiny mohou výběr nákladu ještě dále upřesnit (McMahon and Boucrot, 2011). Následujícím krokem během pučení váčku je sestavení klatrinového obalu. Molekuly klatrinu jsou rekrutovány přímo z cytosolu do míst, kde se nachází koncentrovaně adaptorové proteiny. Klatrin se totiž sám na membránu vázat neumí a tuto vazbu zprostředkovávají právě adaptorové proteiny, které zároveň zajišťují selekci nákladu. Klatrin tak může polymerizovat do podoby „klece“ tvořené hexagony a pentagony. Tím se stabilizuje a zvětšuje prohnutí membrány, které dovoluje maturaci váčku. Prohnutí membrány podporují svou přítomností další efekторы

zakřivení [např. proteiny obsahující BAR doménu (Bin/amphiphysin/Rvs domain)] (McMahon and Boucrot, 2011). Předposledním krokem je odštěpení dozrálého váčku od plazmatické membrány. Zaškrcení tzv. krčku zajišťují specializované proteiny – dynaminy, u rostlin jsou to dynaminu podobné proteiny (DRPs – dynamin related proteins). Avšak pravděpodobně existují i na dynaminu nezávislé cesty, jako např. u kvasinek (Liu et al., 2009). Dynamin svou aktivitou zaškrcuje zúženou oblast mezi plazmatickou membránou a budoucím váčkem. Po dostatečném přiblížení membrán dojde k odštěpení váčku a jeho uvolnění do cytosolu, kterým je dále transportován do cílového místa. Posledním dějem již v cytosolu je depolymerace klatrinu, což je u živočišných buněk zajišťováno heat shock cognate 70 (HSC70) proteinem za pomoci kofaktoru auxilinu. Nejpřístupnější je klatrinová klec v místě odštěpení od membrány, kde zůstává nezacelená. To může být také důvodem, proč k rozebrání klatrinového obalu nedochází již během polymerace. Podjednotky klatrinové klece se poté uvolní do cytosolu a mohou být opět použity pro endocytózu dalšího váčku (McMahon and Boucrot, 2011). U rostlin je proces rozebírání klatrinového obalu prozatím prakticky nepopsán. Rostliny sice kódují HSC70, ale nynější poznatky naznačují, že existují i populace váčků, které pro rozebírání obalu používají jiné cesty než ty zprostředkované HSC70 s kofaktorem auxilinem (Adamowski et al., 2018). Následuje cílený transport, který je zajištěn souhrou cytoskeletu s dalšími proteiny. Váček splývá s cílovým buněčným kompartmentem, jímž je v případě CME raný endozom (EE – early endosome), u rostlin také nazývaný TGN. Po splnutí dochází k třídění nákladu, případně ke zpětné recyklaci proteinů na PM. Složky nákladu mohou být také nasměrovány k degradaci ve vakuole přes pozdní endozom (LE – late endosome) (Paez Valencia et al., 2016). Veškerý vezikulární transport je cílený a řízený podle značení na povrchu endocytovaného váčku. To je důležité pro zachování kompozice proteinů v cílovém kompartmentu. Každá organela v buňce má svou specifickou úlohu, která je určována zejména proteinovým složením na membráně a uvnitř dané organely. Také obaly i náklady v buňce všudypřítomných váčků jsou specifické dle donorové a cílové membrány. V buňce kromě CCV existují i COPI a COPII váčky, o kterých se zmíním v dodatcích (viz kapitola 5.1). Ty se sice nepodílí na endocytóze, ale hrají významnou roli v endosomálním transportu (Singh and Jürgens, 2018).

2.2. Proteiny, které se podílejí na CME

2.2.1. Adaptorové proteinové komplexy

2.2.1.1. Adaptorové proteiny

Rostliny kódují celkem pět AP, z nichž jen dva interagují s klatrinem (AP1 a 2), a pouze AP-2 se podílí na CME (Singh and Jürgens, 2018).

AP hrají důležitou roli při tvorbě váčků pro následný endosomální transport. Zprostředkovávají kontakt jiných proteinů (např. klatrinu) s membránou kompartmentu. Bez AP by tyto proteiny s membránou přímo interagovat neuměly. AP zároveň zajišťují selekci nákladu. Proteiny nákladu jsou selektovány buďto na základě svých aminokyselinových motivů (AA – amino acid), nebo struktury cytosolické části transmembránových proteinů. Příkladem motivu v AA sekvenci nákladu je motiv založený na tyrozinu – YxxΦ – u rostlin rozeznávaný pomocí AP-2 během CME (Owen and Evans, 1998). Identifikaci nakládaného proteinu může být také posttranskripční kovalentní modifikace cytosolické části membránového proteinu. Typicky jí jsou ubiquitinace či fosforylace proteinů učených pro transport (Traub and Bonifacino, 2013). Mnoho adaptorových proteinů interaguje s určitými lipidy v membráně a některé adaptorové proteiny umí způsobovat zakřivení membrány a zároveň ono zakřivení stabilizovat (Zhang et al., 2015).

Rodinu AP proteinů tvoří AP1-5 a COPI-F. Jde o homologní komplexy (pocházející ze společného původního komplexu) a každý z nich přispívá k tvorbě váčku na membráně jiného kompartmentu v rostlinné buňce (Hirst et al., 2011). AP1-5 mají velmi konzervovanou strukturu napříč všemi eukaryotickými organismy. Jsou heterotetramerickými proteiny, které se skládají ze dvou velkých podjednotek ($\gamma/\alpha/\delta/\epsilon/\zeta$ a $\beta 1-5$), jedné střední podjednotky ($\mu 1-5$) a malé podjednotky ($\sigma 1-5$) (McMahon and Boucrot, 2011). Obecně se tyto podjednotky nazývají adaptiny. Právě adaptin μ je důležitý pro rozeznání proteinu určeného jako náklad podle motivu YxxΦ nebo podle motivu založeném na dileucinu [DE]xxxL[LI]. Adaptiny hrají důležitou roli i při tvorbě CCV na PM. Existují však i další doplňkové proteiny, které mohou funkci AP-2 během tvorby CCV zastoupit (McMahon and Boucrot, 2011). U živočišných buněk je jím například protein obsahující Fer/Cip4 homologní doménu (FCHo) a u rostlinných kupříkladu TPC (Henne et al., 2010; Gadeyne et al., 2014).

2.2.1.1.1. AP-2

Ze všech pěti AP se pouze AP-2 komplex podílí na CME na PM (Baisa et al., 2013). Zahajuje tvorbu CCV vazbou na PM a zprostředkovává vazbu klatrinu na PM. Zároveň jeho podjednotky

umí vázat transmembránové proteiny interakcí s jejich cytosolickou částí, na které bývají umístěny motivy pro třídění a díky tomu mohou být rozpoznány jako náklad pro CCV. Na základě analýz mutantních linií jednotlivých podjednotek AP-2 bylo zjištěno, že má vliv např. na endocytózu auxinového transportéru PIN2 (PIN-FORMED 2) (Kim et al., 2013), celulóza syntázy 6 (Bashline et al., 2013) a receptoru brassinosteroidů BRI1 (brassinosteroid insensitive 1) (Rubbo et al., 2013).

O AP-2 je známo, že existuje ve dvou formách. V 'uzamčené' (inaktivní) a 'otevřené' (aktivní), kdy se stává přístupným pro vazbu nákladu a klatrinu. Jedná se o auto-inhibiční mechanismus, který zabraňuje vazbě klatrinu na cytosolický AP-2. Velká konformační přeměna komplexu AP-2 z inaktivní na aktivní formu je způsobena vazbou komplexu na membránu obsahující fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PIP2 - PtdIns(4,5)P₂) (Kelly et al., 2014).

Je heterotetramerickým proteinem, jehož jednotlivé podjednotky zastupují různé funkce. Velká podjednotka α zajišťuje vazbu k PM. Velká podjednotka $\beta 2$ rekrutuje klatrin a umožňuje tak jeho polymerizaci a tím tvorbu klatrinového obalu. Zároveň přispívá k výběru nákladu. Střední podjednotka $\mu 2$ slouží pro rozpoznání motivu YXX Φ (Bar et al., 2009). Tento motiv v rostlině slouží nejen jako signál pro ligandem navozenou endocytózu u LeEix2 (Bar et al., 2011), ale také jako signál pro degradaci v případě BOR1 (receptor boru). Malá podjednotka $\sigma 2$ dodává stabilitu celému komplexu (Lee and Hwang, 2014). U živočichů vede vyřazení některé z podjednotek ke smrti embrya. Oproti tomu u rostlinné mutantní linie vykazují pouze mírné vývojové vady a jsou stále životaschopné. U *Caenorhabditis. elegans* bylo zjištěno, že AP-2 částečně funguje jako dva hemikomplexy (α - $\sigma 2$ a $\beta 2$ - $\mu 2$). Letální je pouze poškození obou hemikomplexů zároveň. U rostlin tato možnost ještě nebyla objasněna. Zůstává to prozatím jako jedno z možných vysvětlení, proč při *ap2* mutaci dochází pouze k mírné změně fenotypu rostliny (Zhang et al., 2015).

2.2.1.2. TPLATE komplex

TPLATE komplex (TPC) je poměrně nedávno objevený raný adaptorový proteinový komplex CME specifický pro rostliny (Zhang et al., 2015). TPC je naprosto nepostradatelný pro růst pylové láčky a vývoj rostliny. Naproti tomu bez AP-2 komplexu je rostlina schopna přežít (Gadeyne et al., 2014). TPC je složen z osmi podjednotek a u živočišných a kvasinkových buněk nenajdeme žádné jednoznačné homology těchto podjednotek. U améby *Dictyostelium discoideum* byl v posledních letech objeven starobylý adaptorový komplex TSET (Hirst et al.), který obsahuje homology některých podjednotek TPC. Z evolučního hlediska je TSET/TPC starobylejší než AP a tvoří chybějící článek mezi COPI a AP, které jsou vzdáleně příbuzné.

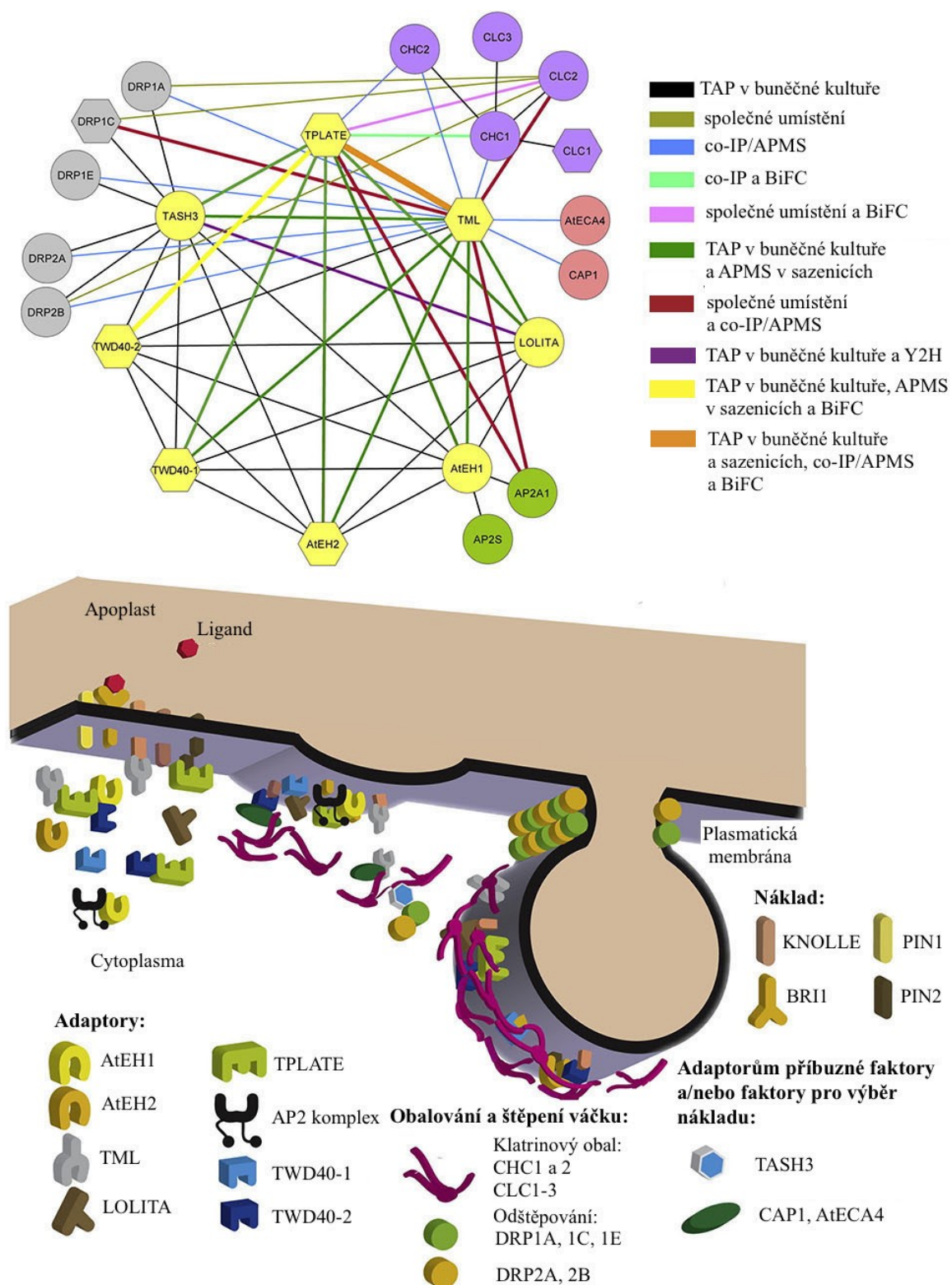
TSET/TPC se vytratil z několika větví eukaryot, přestože u živočichů a kvasinek to vypadá, že pozůstatkem po TSET/TPC jsou munisciny, které by mohly být odvozeny od podjednotky TML. Tato podjednotka obsahuje C-terminální μ HD doménu. TML podjednotku *Dictyostelium* ztratilo. U *Arabidopsis thaliana* (*At*) však tato doména hraje nenahraditelnou roli při rekrutování TML na PM a při sestavování TPC (Zhang et al., 2015).

TPC hraje důležitou roli v rané fázi tvorby váčku. Je jedním z prvních elementů rekrutovaných na PM, a to ještě před AP-2, klatrinem a DRPs (Zhang et al., 2015). To svědčí o funkci TPC v rané fázi CME (Gadeyne et al., 2014).

Z osmi podjednotek byla tou první objevenou TPLATE podjednotka (Damme et al., 2011). Později byly popsány i ostatní: LOLITA, TWD40-1, TWD40-2, AtEH1, AtEH2, TML a TASH3. Svůj název získaly na základě segmentů již známých domén v jejich AA sekvenci. Tyto podjednotky fyzicky i geneticky interagují s mnoha konzervovanými složkami CME. Jednotlivé podjednotky zprostředkovávají interakce s klatrinem, PM, AP-2, s proteiny obsahujícími ANTH doménu a s DRPs. (Gadeyne et al., 2014). Například TASH3 obsahuje Src homology 3 (SH3) doménu, o které je známo, že umí rekrutovat DRPs. TML, AtEH1, AtEH2 a TASH3 obsahují domény, které u živočišných buněk zajišťují stabilizaci AP-2 komplexu na PM. S jistotou však byla definována pouze funkce μ -homologní domény na TML (viz výše) (Zhang et al., 2015).

2.2.1.3. Souhra TPC a AP-2 komplexů během CME

V některých podjednotkách TPC jsou přítomny domény, které jsou podobné doménám v proteinech živočišných buněk, které zajišťují rekrutování AP-2. To naznačuje, že by TPC mohl hrát roli v CME jako prvek rekrutující AP-2 na PM v rostlinných buňkách. Tuto hypotézu podporuje společné umístění AP-2 a TPC na PM ve více než 50 %. Zároveň tomu nasvědčuje i snížená přítomnost AP-2 na PM při umlčení *TML*. TPC tedy pravděpodobně přispívá ke stabilizaci AP-2 komplexu na PM, ale není k tomu vyloženě nezbytný (Gadeyne et al., 2014). Asi ve 30 % (TPC) a 20 % (AP-2) jsou rané adaptorové komplexy na PM lokalizovány samostatně, což napovídá, že TPC a AP-2 mají jak rozdílné, tak překrývající se funkce (Zhang et al., 2015). TPC na místo vzniku budoucího váčku na PM dorazí jako první a zároveň na PM většinou zůstává i po odloučení AP-2 (tedy asi po odštěpení váčku). Svým chováním připomíná okrajový komplex, známý z živočišných buněk, skládající se z FCHo, Eps15 a intersektinu, který je také vyloučen z váčku během jeho tvorby (Gadeyne et al., 2014).



Obrázek 1 – Přehled interakcí proteinů a model klatrinem zprostředkované endocytózy
Převzato z (Gadeyne et al., 2014)

2.2.1. Monomerické adaptory

Rostlinné buňky obsahují kromě AP komplexů a TPC také další adaptory, které se podílí na tvorbě CCVs. Jedná se o monomerické adaptory, které obsahují např. E/ANTH doménu. Proteiny obsahující ANTH doménu se podílejí na endocytóze. TOL proteiny (TARGET OF RAPAMYCIN LIKE) jsou využívány pro výběr nákladu z PM, který je určený pro degradaci ve vakuole (Zouhar and Sauer, 2014). Dále protein AP180 hraje roli během endocytózy. Epsinu podobné klatrinové adaptory 1, 2 a 4 (ECA1, 2, 4 - Epsin-like clathrin adaptor 1, 2, 4) jsou lokalizovány na PM a endosomech a během dělení buňky i na buněčné desce. Pro bližší objasnění jejich funkce v rostlinné buňce bude potřeba dalšího bádání (Lee and Hwang, 2014).

2.2.2. Klatrin

Klatrin je obalový protein podílejší se na endocytóze stabilizací zakřivení membrány v místě vzniku budoucího váčku a zároveň toto vyklenutí prohlubuje. Tím přispívá k dozrávání váčku. Jednotlivé klatrinové molekuly jsou rekrutovány z cytosolu na PM do místa koncentrace adaptorových proteinových komplexů. Polymerizací se klatrinové molekuly skládají do struktury podobné kleci (McMahon and Boucrot, 2011). Struktura má pravidelné uspořádání, obsahuje okénka, která mívají tvar hexagonu, pentagonu či heptagonu (viz Obrázek 2). Pokud by v dané struktuře byl přítomen pouze hexagonální tvar, zůstala by planární. Jestliže struktura obsahuje i pentagony, nabývá zakřiveného tvaru. Počet a umístění pentagonů udává tvar a velikost vznikajícího váčku (Kirchhausen, 2000).

Klatrinová podjednotka (nazývaná triskelion) má centrální uzel, ze kterého vybíhají tři „nohy“. Každá je tvořena jedním těžkým klatrinovým řetězcem (CHC – clathrin heavy chain), jak je vidět na Obrázek 2, a na každém CHC blíže uzlu je pevně připojen lehký klatrinový řetězec (CLC – clathrin light chain). Triskelion není planární molekula. Má spíše tvar obrácené misky. Téměř po celé délce „noh“ klatrinu je přítomno zakřivení. Pro sestavení klece je nutná flexibilita jednotlivých molekul klatrinu. Při sestavování klece spolu nohy klatrinových podjednotek antiparalelně interagují. Struktury z triskelionů vznikají i v *in vitro* podmínkách za nepřítomnosti dalších proteinů (Kirchhausen, 2000). *In vivo* se na tvorbě klatrinového obalu podílí další proteiny, protože sám není schopen se vázat přímo na fosfolipidy PM. Kontakt zprostředkovávají adaptorové proteiny (Paez Valencia et al., 2016). Ty obsahují specifické AA sekvence, tzv. „klatrinové boxy“ ($L\Phi X\Phi D/E$ – kde Φ zastupuje hydrofobní AA zbytek), které váží terminální doménu CHC. Klatrinový obal je tedy přibližně ve vzdálenosti 200 Å od PM a mezičlásky jsou adaptorové proteiny (Kirchhausen, 2000).

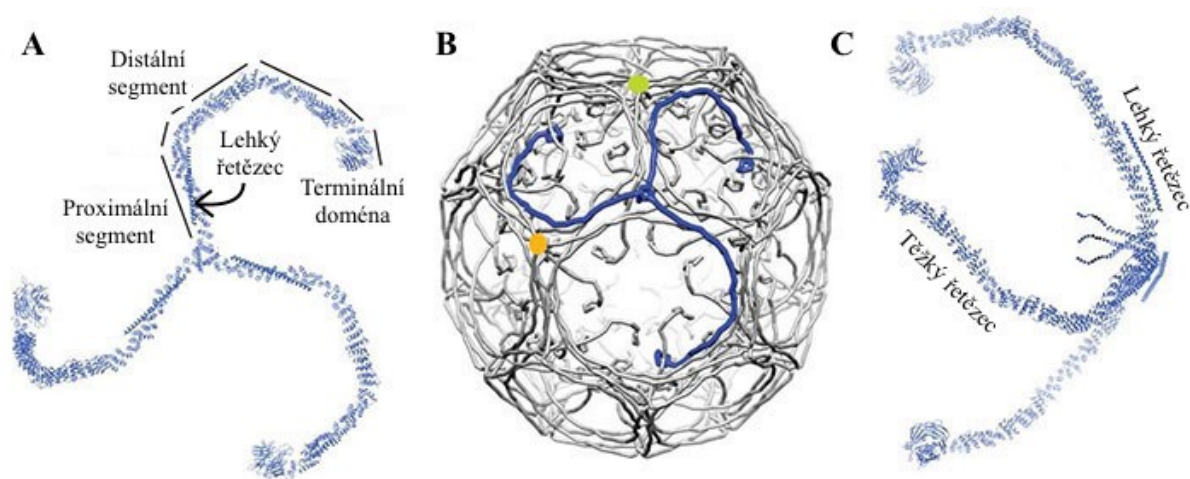
At kóduje dva různé CHC (CHC1 a CHC2) a tři CLC (CLC1 až CLC3) geny (Wang et al., 2013a). Díky *chc* knock-outům v *At* bylo prokázáno, že CME je nezbytným procesem pro vývoj a růst rostliny (Chen et al., 2011).

CHC1 a 2 jsou na úrovni aminokyselinové sekvence z 90 % identické a funkčně se překrývají. Přesto ale linie mutantní v genech pro *chc1* a *chc2* mají různé fenotypy. Mutantní linie *chc2* má fenotypové projevy již ve fázi embrya, kdežto rostlina *chc1* má normální fenotyp (Paez Valencia et al., 2016). Rostliny mutantní v genech pro *chc1*, *chc2* a *has1* (což je nová alela pro *chc1* u *At*) jsou odolnější než wild type vůči stresu způsobeným nedostatkem vody (Larson et al., 2017).

CLC 1-3 jsou v AA sekvenci přibližně z 55 % identické. U živočichů a kvasinek CLC stabilizují a podporují sestavení tří CHC do triskelionu (Ybe et al., 2007). Podporují také polymerizaci klatrinu během tvorby CCV díky konformační změně, kterou CLC navozují v CHC (Wilbur et al., 2010). Proto se předpokládá, že role CLC bude důležitá a mnohotvárná i u rostlin. V rostlinné buňce CLC regulují asociaci CHC na membránu. U *clc2* a *clc3* mutantní linie dochází méně často k pohlcování proteinů z PM. Přesný způsob, jakým CLC působí na CHC a na četnost vazby CHC na PM, bude potřeba ještě experimentálně přesněji popsat (Wang et al., 2013a).

Po odštěpení váčku od membrány dochází k depolymerizaci klatrinového obalu. U živočišných buněk rozebírání obalu zajišťuje ATPáza HSC70 za přítomnosti kofaktoru auxilinu. Rozvolňují klatrinovou klec, ze které se zpět do cytosolu uvolňují jednotlivá triskelia. Mohou tak být opět recyklována pro tvorbu dalšího váčku. Tímto se odkryje membrána váčku se SNARE proteiny (soluble NSF attachment protein receptor), díky kterým může váček putovat k cílovému kompartmentu a splynout s ním (McMahon and Boucrot, 2011).

Přesný proces rozebrání obalu po odštěpení váčku u rostlin není popsán. Bylo objeveno několik proteinů, které obsahují domény jako má živočišný auxilin – AUXILIN-LIKE 1 a 2 (AL1, AL2). Obsahují C-terminální doménu DNAJ. O AL1 se již dříve předpokládalo, že se podílí na rozebírání klatrinového obalu (Lam et al., 2001). Studie posledních let ale neprokázaly, že by tomu tak s jistotou muselo být. Při overexpresi AL1 a AL2 dochází k inhibici endocytózy už ve fázi rekrutování klatrinu (Adamowski et al., 2018).



Obrázek 2 – (A) Klatrinový triskelion – pohled shora (B) Složení triskelionů do tzv. „D6 barelu“ – nejjednodušší a nejmenší klatrinová „klec“ – modře je vyznačena jedna molekula triskelionu (C) Pohled z boku na triskelion
Upraveno dle (Kirchhausen et al., 2014)

2.2.3. Dynamin a DRPs

Dynamin byl objeven v roce 1989 (Shpetner and Vallee, 1989). Podílí se na endocytóze v živočišné buňce (Antonny et al., 2016). Jsou to velké GTPázy, které mají nízkou afinitu k nukleotidům a zároveň jejich GTPázová aktivita je vysoká. Umí tvořit polymery ve tvaru prstence (Hinshaw and Schmid, 1995) či spirálovité struktury (Antonny et al., 2016; Sweitzer and Hinshaw, 1998). Nejlépe popsáný je živočišný dynamin 1, který polymerizuje do podoby kruhové/spirálovité struktury okolo krčku zrajícího váčku a díky změně konformace navozené hydrolýzou GTP (guanosin trifosfátu – guanosine triphosphate) ho zaškrtní. Tím se váček uvolní do cytosolu (Sweitzer and Hinshaw, 1998). Dynamin má 5 domén – GTPázovou doménu (Niemann et al., 2001), střední doménu, efektorovou doménu GED (GTPase effector domain), plekstrin homologní doménu (PH – pleckstrin homology domain) a doménu bohatou na prolin (PRD – proline rich domain). Tyto domény dle svých vlastností slouží pro specifické funkce (Praefcke and McMahon, 2004). Dynaminy jsou rekrutovány na membránu pomocí interakcí s membránovými lipidy a proteiny pomocí PRD a PH domény (Taylor, 2011). PH doména se umí vázat na fosfolipidy a PIP2, který je specifický pro PM (Mayinger, 2012). PRD interaguje s SH3 doménou proteinů (Fujimoto and Tsutsumi, 2014).

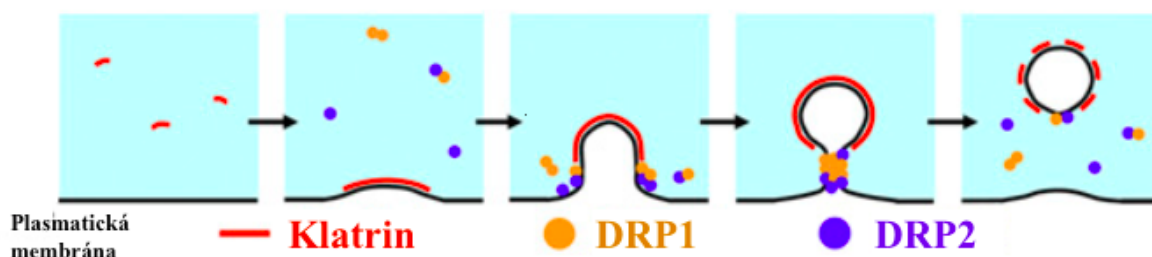
V rostlinné buňce sice není dynamin 1, ale zastupují ho DRPs (Antonny et al., 2016). V rostlině DRPs hrají roli v mnoha důležitých buněčných procesech jako je endocytóza, buněčné dělení, štěpení a fúze mitochondrií, vakuolární třídění a biogeneze peroxizomů (Fujimoto and Ueda, 2012). Suchozemské rostliny obsahují celkem šest typů DRPs. Z toho 2 se podílejí na

endocytóze a zároveň se podílejí i na procesech spojených s tvorbou buněčné desky během buněčného dělení (Fujimoto and Ueda, 2012). Jedním z typů podílejících se na CME je typ DRP2, který má stejné složení domén jako dynamin. Druhým je typ DRP1 (původně známý jako fragmoplastin) se složením specifickým pro rostliny. DRP1 postrádá PRD a PH doménu (Hong et al., 2003), ale zato je jeho GTPázová podjednotka podobnější (62 %) GTPázové podjednotce dynaminu 1 než je podobnost (29 %) dynaminu 1 s DRP2 (Fujimoto and Tsutsumi, 2014). I přes nepřítomnost PH domény studie ukázaly, že se DRP1 umí vázat na fosfatidylinositoly (PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns5P) a na fosfatidylserin (Bednarek and Backues, 2010). Linie mutantní v genu pro *drp1a* měla narušenou endocytózu markeru FM4-64, což svědčí o roli DRP1A během CME (Collings et al., 2008).

DRP2A a DRP2B jsou exprimovány všude v rostlině a ve větší míře v kořenovém apikálním meristému a v oblasti svazků žilnatiny. Fungují koordinovaně a jejich funkce se také nejspíše překrývají. Hrají roli v post-Golgi transportu, kde je jejich funkce závislá na správné polymerizaci cytoskeletu (Huang et al., 2015). Mimo jiné hrají roli během endocytických dějů (Taylor, 2011).

DRPs interagují i s dalšími proteiny, například DRP1 váže VAN3, který obsahuje BAR doménu. Tato doména umí rozpoznat a způsobovat zakřivení membrány (Fujimoto and Tsutsumi, 2014). DRP2B a DRP1A se spolu pravděpodobně vážou do komplexu (viz Obrázek 3). Společně jsou lokalizovány na PM, v místě vznikajícího CCV. Data svědčí o tom, že se podílejí na CME v rostlinách. Na membráně se tento komplex skládá již během maturace pučícího váčku a rozpadá se ve chvíli odštěpení váčku (viz Obrázek 3; Fujimoto et al., 2010). Pokud je to tak, že se spolu DRP1 a DRP2 komplementárně podílejí na společné funkci, jednalo by se o unikátní mechanismus endocytózy (Fujimoto and Ueda, 2012).

Obecně je dynamin a DRPs na základě výše zmíněných poznatků přijímán jako protein, který zprostředkovává odštěpení váčku. Přesto však prozatím nejsou zcela jasné detaily procesu zaškrvení, jako například jak přesně je energie získaná z hydrolýzy GTP využívána. Prozatím existují pouze modely, jak dynamin působí konstrikci membrán a její štěpení (Antonny et al., 2016). V každém z nich však prozatím zůstávají otázky a mechanismus zaškrvení je nadále předmětem diskuse. U rostlin navíc vyvstávají další otázky, jak přesně DRP1 a DRP2 heterokomplex zajišťuje odštěpení CCV a jaké další proteiny tuto událost během CME podporují (Fujimoto et al., 2010; Fujimoto and Ueda, 2012).



Obrázek 3 – Schéma tvorby CCV za přítomnosti DRP1-DRP2 komplexu
Převzato z (Fujimoto et al., 2010)

2.2.4. Cytoskelet

Na zakřívování membrány během tvorby CCV se v kvasinkách a živočišných buňkách podílí také aktinový cytoskelet. U živočichů je to zejména v pozdějších fázích tvorby CCV. Okolo okrajů tvořícího se CCV aktin polymerizuje do větvené sítě aktinových filament. Klíčovými proteiny pro regulaci tvorby větvených aktinových filament jsou proteiny z rodiny WASP. Ty rekrutují a aktivují ARP2/3 komplexy, které umožňují nukleaci větvených aktinových filament. Procesu polymerizace aktinu se účastní i další proteiny, které se vážou na klatrin, na aktin a na PIP2 nacházející se v PM. Kromě hlavního zdroje síly pro zakřivení membrány – polymerizace filament – se pravděpodobně na vytváření síly pro vyklenutí membrány podílí i myozin (Kaksonen and Roux, 2018).

U rostliny se o takovéto spojitosti mezi aktinovým cytoskeletem a CME ví velmi málo (Chen et al., 2011). Prozatím je známo jen několik vodítek, které naznačují takovouto spojitost. Jednak stabilizace dynamiky aktinu vede k inhibici endocytózy (Dhonukshe et al., 2008). Například ROP2 GTPáza vyvolává nahloučení F-aktinu v určitém místě rostlinné buňky, což zabrání internalizaci PIN1 transportéru (Nagawa et al., 2012). Podobně i SPIKE1, který aktivuje ROP6-RIC1 dráhu v meristematických buňkách kořene, stabilizuje touto cestou aktinová filamenta a to údajně vede k narušení internalizace PIN2 (Chen et al., 2012; Lin et al., 2012). Dalším vodítkem je doplňkový adaptorový protein SH3P1, který váže aktin (Lam et al., 2001). Při overexpresi jiného doplňkového adaptorového proteinu EHD dochází zase k narušení dynamiky aktinového cytoskeletu (Bar et al., 2009). Je tedy otázkou, zda se na CME podílejí aktinový cytoskelet a ARP2/3 komplex i u rostlin. V současnosti je tato problematika studována, mj. na naší katedře.

Vliv mikrotubulů na CME je bohužel ještě méně jasný (Chen et al., 2011).

2.3. Regulace CME

2.3.1. Malé GTPázy

Malé GTPázy jsou proteiny, které mají schopnost hydrolyzovat GTP na GDP (guanosindifosfát – guanosine diphosphate). Mají široké uplatnění v regulaci mnoha procesů v buňce, včetně endosomálního transportu váčků. Obecně malé GTPázy fungují jako spínače, které mají dvě formy. Aktivní forma s navázaným GTP způsobí konformační změnu GTPázy, a tím její přichycení na specifickou membránu. Na membráně příslušného kompartmentu buňky následně aktivuje další proteiny – efekторы. V inaktivní formu se mění poté, co dojde k hydrolýze GTP na GDP. Mezi těmito dvěma stavy cykluje díky svým regulátorům. Jedním typem regulátorů jsou guanin výměnné faktory (GEF – guanine exchange factor), které pomáhají uvolnit GDP a tím umožní navázání cytosolického GTP (Yorimitsu et al., 2014). Druhým regulátorem jsou proteiny aktivující GTPázu (GAPs – GTPase-activating proteins), které vyvolávají GTPázovou aktivitu GTPázy. Dojde k hydrolýze GTP a GTPáza se inaktivuje a disociuje od membrány.

Do rodiny malých G proteinů podobných Ras proteinům patří pět podskupin, ze kterých jsou v rostlině přítomny pouze čtyři – Arf, Rho, Rab a Ran (Molendijk et al., 2004). U Arf, Rho a Rab byla zjištěna potenciální účast na endocytických procesech u rostlinné buňky.

2.3.1.1. ARF

ADP-ribosylační faktory (ARF – ADP-ribosylation factor) jsou malé proteiny, které vážou GTP. Na svém N-terminálním konci obsahují myristoylovou kotvu. Ta pevně váže aktivní ARF (s navázaným GTP) na membránu jeho cílového působení (Nielsen et al., 2006). Na membráně se ARF setkává se svými efekторы a regulátory. Inaktivní forma s GDP je většinou cytosolická, někdy slabě vázaná na membránu (Donaldson and Jackson, 2000). ARF regulují tvorbu váčků, tvorbu struktur organel a vývoj mnohobuněčných rostlin (Yorimitsu et al., 2014).

U živočichů se ARF GTPázy dělí do tří tříd (I.-III.). U živočichů v procesech spojených s PM, včetně CME, působí Arf6, který patří do III. třídy (Donaldson and Jackson, 2000). Rostliny druhou a třetí třídu postrádají, z té první jim také schází protějšek Arf2 GTPázy. Zato obsahují rostlině specifické ARFA a ARFB (a možná ještě další), jejichž role prozatím zůstává neobjasněna (Singh and Jürgens, 2018). Přestože lokalizace ARFB je na PM, nelze z toho vyvozovat jeho roli v endocytickém transportu (Yorimitsu et al., 2014).

2.3.1.1.1. ARF-GEFs

ARF-GEF jsou regulátorem pro ARF GTPázy (Naramoto et al., 2010). Obsahují SEC7 doménu, která katalyzuje výměnu GDP za GTP. Při aplikaci houbového toxinu Brefeldinu A (BFA) na rostlinnou buňku dojde k blokaci výměny GDP za GTP u ARF GTPáz. BFA se totiž připojí do místa katalytického působení na SEC7 doméně ARF-GEF proteinu (Singh and Jürgens, 2018). BFA se tak často používá při studiu endosomálního transportu, protože aplikace zamezuje sekretorický transport váčků a v menší míře způsobuje i pokles počtu endocytovaných váčků. Tím u rostlin dojde k akumulaci váčků do takzvaných BFA kompartmentů (Naramoto et al., 2010).

At kóduje tři ARF-GEF skupiny GBF–GNOM, GNL1 (GNOM-LIKE 1), GNL2 –a pět dalších, náležících do skupiny BIG1 – BIG1-5. Pouze některé z nich jsou citlivé na BFA (Naramoto et al., 2014). *At* nekóduje ale ani malé ani střední ARF-GEF, kam patří i ARF-GEF EFA6 regulující Arf6, který se podílí na endocytóze u živočichů (Singh and Jürgens, 2018).

Nejprostudovanějším rostlinným ARF-GEF je GNOM. Je důležitým proteinem pro správný vývoj rostliny a pro veškeré procesy, které vyžadují správný transport auxinu. Podílí se totiž na recyklaci PIN auxinových transportérů z TGN na PM. (Naramoto et al., 2014)

Při aplikaci BFA asociují ARF-GEF proteiny s membránami, kde za normálních okolností katalyzují výměnu GDP za GTP na ARF-GTPázách. Avšak blokovány BFA tuto výměnu neumožní. To dovoluje pozorovat místo jejich působení. GNOM je převážně lokalizován na Golgiho aparátu a v menší míře i na PM (Naramoto et al., 2010, 2014).

2.3.1.1.2. ARF-GAPs

Proteiny aktivující ARF-GTPázu stimulují hydrolýzu GTP připojeného na ARF GTPáze a tím navracují ARF do inaktivního stavu. Jsou tedy také jejím regulátorem. Jsou protihráčem GEF a spolu způsobují cyklické fungování ARF GTPáz (Naramoto et al., 2010).

V *At* je znám ARF-GAP VASCULAR NETWORK DEFECTIVE 3 [VAN3; známý také jako AGD3 (ARF-GAP domain protein) či SCARFACE (SFC)], který je zásadní pro správnou tvorbu vodivých pletiv. Váže se na fosfatidylinositol 4-fosfát (PI4P – phosphatidylinositol 4-phosphate) (Singh and Jürgens, 2018). VAN3 je důležitým proteinem při endocytóze, včetně internalizace PIN auxinových transportérů (Yorimitsu et al., 2014).

VAN3 spolu s GNOM hraje důležitou roli ve vývoji rostliny (Singh and Jürgens, 2018). VAN3 a GNOM asociují s PM, kde se místa jejich výskytu částečně překrývají. To by naznačovalo, že jejich fungování je ve vzájemném vztahu. Zároveň jsou spolu přítomny i v místech, kam je

rekrutován klatrin a pravidelně zde dochází ke tvorbě klatrinem pokrytých prohlubní (CCPs – clathrin coated pits). To vše by napovídalo tomu, že hrají roli v procesech spojených s CME. Přestože je to asi primárně GNOM, který je vyžadován pro CME, částečně umí jeho funkci přebrat GNL1. Avšak prozatím je velmi málo dostupných informací o tom, jak se ARF GTPázy, jejich regulátory a efekty podílí na CME. (Naramoto et al., 2010)

2.3.1.2. Rab

Malé G proteiny Rab se podílejí na správném transportu endosomálních váčků v buňce. Spolu se SNARE proteiny se podílejí na rozpoznání cílového kompartmentu pro váček a splnutí s ním (Uemura and Ueda, 2014). Díky tomu zůstává zachováno specifické složení jednotlivých kompartmentů v buňce.

V živočišné buňce se na CCV a EE nalézá Rab5. Podílí se na CME a fúzi endocytovaných váčků s EE (Rodman and Wandinger-Ness, 2000). Přestože Rab5 proteiny jsou napříč eukaryoty konzervované, u rostlin najdeme i rostlině specifickou Rab5 GTPázu ARA6 (známou také jako RABF1) (Ueda et al., 2001). ARA6 reguluje v rostlinné buňce více procesů (Uemura and Ueda, 2014). Za normálních okolností se ARA6 nachází na endosomech, ale příležitostně se rychle přemístí na PM. Na PM sdílí umístění se SYP121 a VAMP727, což jsou SNARE proteiny. ARA6 by se tedy mohl podílet na tvorbě SNARE komplexu na PM. V místech výskytu ARA6 na PM se zdá být klatrin vyloučen (Ebine et al., 2011). Prozatím se toho však o přesném fungování ARA6 na PM, jeho efektech a případně nákladu, na jehož endocytóze se podílí, mnoho neví. S jistotou se však podílí na odpovědi buňky na vysoký obsah soli v prostředí – při zvýšené expresi genu *ARA6* dojde i ke zvýšené rezistenci k solnému stresu (Ebine et al., 2011).

2.3.1.3. ROP

Rostlinné malé GTPázy příbuzné Rho, zkráceně nazývané ROP (Rho-like GTPase of plants) jsou také molekuly fungující jako buněčné spínače aktivované dle navázaného GTP či GDP (stejně jako Arf a Rab). V rostlinné buňce je celkem 11 členů této rodiny proteinů (ROP1-11) a podílejí se na regulaci mnoha buněčných procesů včetně endocytózy (Han et al., 2018). ROP6 GTPáza z této rodiny byla popsána jako regulátor endocytózy. Je lokalizována na PM, kde interaguje se svým downstream efektem RIC1 a společně zabráňují vzniku CCV. Inhibují tak internalizaci PIN1 a PIN2 (Lin et al., 2012) auxinových transportérů, čímž ovlivňují auxinem zprostředkovanou odpověď na stimulaci gravitací a také tím mají vliv na vzorování žilnatiny listů (Chen et al., 2012). ROP6 je regulován GEF proteinem SPIKE1 (Basu et al., 2008), ale

také auxinem (Chen et al., 2012), asociací s lipidovými rafty obsahujícími lipidy s S-acylací cysteinu (Sorek et al., 2010), světlem a také fosfatidylglycerolem (Han et al., 2018).

Další GTPázou, která má vliv na CME, je ROP2. Může být aktivována auxinem. ROP2 inhibuje endocytózu PIN1 transportéru aktivací svého efektoru RIC4. Ten navodí nahloučení aktinových mikrofilament v kortikální části buňky a tím zabrání endocytóze (Nagawa et al., 2012).

2.3.2. Hormony

Auxin podléhá směřovanému toku podle umístění transportérů, které cyklují mezi endosomálními kompartmenty a PM díky internalizaci pomocí CME a zpětné recyklaci z endosomů na PM. Patří mezi ně i PIN přenašeče, které zajišťují export auxinu z buňky. Signalizace auxinem inhibuje internalizaci PIN1, PIN2 a dalších proteinů, a tím se zvýší počet PIN transportérů na PM (Paciorek et al., 2005; Pan et al., 2009). Auxin tak může regulovat svůj tok rostlinou. Tomu nasvědčuje i změna toku auxinu kořenem během odpovědi na gravitaci. Tato odpověď je doprovázena inhibicí endocytózy v buňkách kořene, ve kterých se zvýšil auxinový tok (Paciorek et al., 2005; Pan et al., 2009). Jedním z receptorů auxinu je ABP1 (AUXIN-BINDING PROTEIN1) (Sauer and Kleine-Vehn, 2011), který funguje jako pozitivní regulátor endocytózy. Zdá se, že ve chvíli, kdy se na něj naváže auxin, je jeho aktivita blokována. To vede k inhibici endocytózy, aniž by pro signalizaci auxinem byla nutná transkripce (Robert et al., 2010). Auxin také v buňce ovlivňuje asociaci CHC a CLC s PM, čímž zasahuje do tvorby CCV (Wang et al., 2013a).

Brassinosteroidy (BRs) jsou endogenní rostlinné hormony, které jsou nezbytné pro správný růst a vývoj rostliny (Clouse, 2015). BRs jsou registrovány pomocí receptorů BRI1, které cyklují mezi PM a TGN nezávisle na vazbě s BR. Pro internalizaci BRI1 buňka hojně využívá CME (Martins et al., 2015), ale v posledních letech se objevují i poznatky o využití CIE k pohlcení BRI1 (Wang et al., 2015). BRI1 je často endocytováno a směřováno k degradaci, když po navázání BR heterodimerizuje s BAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE 1) (Wu et al., 2011). Stejně tak ubiquitinace receptoru BRI1 vede k jeho pohlcení a degradaci ve vakuole (Martins et al., 2015).

Cytokinin a auxin vzájemně koordinují své aktivity (Marhavý et al., 2014). Jedním z mechanismů přispívajících k této koordinaci je, že cytokinin reguluje recyklaci endocytovaných PIN1 přenašečů tak, že je směřuje k degradaci ve vakuole. Tím reguluje množství PIN1 přenašečů na PM, a nakonec i tok auxinu (Marhavý et al., 2011). Cytokinin

podporuje tento pokles přítomnosti PIN1 na PM v určitých polárních oblastech buňky, a tím dovede přeorganizovat směr auxinového toku v rostlině (Marhavý et al., 2014).

Kyselina salicylová (SA – salicylic acid) zprostředkovává obranné odpovědi rostliny na napadení patogenem (An and Mou, 2011). Podílí se však i na regulaci internalizace proteinů PM. SA inhibuje endocytózu, a to pravděpodobně zabráněním klatrinu v asociaci s PM. Tato regulace probíhá nezávisle na transkripci a komponenty této SA signální dráhy jsou doposud neznámé (Du et al., 2013).

Strigolakton (SL – strigolactone) je dalším hormonem, který v rostlině působí změny v endocytických dějích – způsobuje rychlé odčerpání PIN1 transportérů z PM pomocí CME (Shinohara et al., 2013). Způsobuje také zvýšenou polarizaci PIN2 přenašečů na PM a také jejich častější internalizaci. SL též ovlivňuje dynamiku F-aktinu, který je potřebný pro správné ustanovení polarity PIN přenašečů (Nagawa et al., 2012; Pandya-Kumar et al., 2014).

Kyselina abscisová navozuje selektivní endocytózu KAT1 (transportéru pro draslík), který může být zpětně recyklován na PM. Studie naznačuje, že KAT1 transportér je pohlcen do speciálních, doposud nepopsaných endosomálních kompartmentů (Sutter et al., 2007). KAT1 se na PM vyskytuje v rámci mikrodomén (Reuff et al., 2010). V případě KAT1 není doposud jasné, zda se opravdu jedná o CME. Je možné, že buňka pro internalizaci transportéru KAT1 využívá některé CIE cesty.

2.3.3. Složení membrány

Celkové složení membrány má vliv nejen na její stabilitu, ale i procesy, které na membráně probíhají. Kupříkladu lipidové složení membrány působí na transmembránové proteiny a jejich funkci (Bogdanov et al., 2014). Fosfatidylinositoly (PIs – phosphatidylinositols) jsou rodinou lipidů, které se kromě dalších rolí podílí i na regulaci vezikulárního transportu. V membránách tvoří pouze minoritní složku, ale jejich specifické a stabilní rozmístění v rámci kompartmentů (Simon et al., 2013) slouží pro řízení vezikulárního transportu na dané organele. Jedním z PI je PI(4,5)P₂, který je umístěn převážně na PM. Na CME se PIP₂ podílí přímou vazbou AP-2, AP180 a dalších adaptorových proteinů (Mayinger, 2012). Hladina PIP₂ v PM také přímo ovlivňuje míru vazby klatrinu na PM (Chen et al., 2011; Zhao et al., 2010). Při snížené přítomnosti PIP₂ v PM dochází ke změně vazby klatrinu na PM – tvoří větší okrsky. Ve fázi odštěpování váčku dojde pravděpodobně k narušení jeho tvorby, a tak dojde ke splynutí vícero menších oblastí, kde se CCV tvoří, protože pučící váčky se nemohou odloučit od PM. To by nasvědčovalo, že u rostlin je stejně jako u živočichů k odštěpení váčku potřeba PIP₂ (Ischebeck

et al., 2013; Lemmon and Ferguson, 2000). Veškeré poznatky tedy nasvědčují tomu, že PIP2 slouží jako platforma rekrutující velkou část molekulárního aparátu CME (Chen et al., 2011). Dalším PI je PI4P (fosfatidylinositol-4-fosfát), který se podílí na finální fázi CME ve špičce rostoucích pylových láček (Zhao et al., 2010).

Steroly jsou důležitou složkou membrány, která ovlivňuje její fluiditu a také reguluje CME. Jsou běžnou složkou mikrodomén (Chen et al., 2011). Prozatím nebyla přesně definována role sterolů v CME u rostlin. Mají však pravděpodobně klíčovou roli v regulaci endocytózy PIN1, PIN2 (Men et al., 2008) a některých dalších proteinů (Pan et al., 2009). Správnou kompozici sterolů v PM pro své fungování vyžadují proteiny DRP1A, DRP1C a CLC (Konopka and Bednarek, 2008).

2.3.4. Ubikvitinace

2.3.4.1. Ubikvitin a jeho funkce

Ubikvitin je vysoce konzervovaný protein, který se nachází ve všech eukaryotických buňkách (Pickart and Eddins, 2004). Kovalentně se může vázat na proteiny, čemuž se říká ubiquitinace. Je to jednou z nejběžnějších post-transkripčních modifikací proteinů, která zprostředkovává mnohé interakce mezi proteiny. Tato modifikace hraje důležitou roli v buněčných procesech (Scheuring et al., 2012).

Ubikvitinace je sled tří po sobě jdoucích kroků, které provádí tři enzymy (E1-3). Reakce se může opakovat a dát vznik polyubikvitinovému řetězci. Mohou následovat dva scénáře. Pomocí deubikvitináz (DUBs – deubiquitinases) mohou být jednotky ubikvitinu od proteinu odpojeny nebo může být cílový protein [většinou s polyubikvitinovým řetězcem na Lys48 (Pickart, 1997)] naštípán v 26S proteasomu (Vierstra, 2009). Ukázalo se však, že (multi)monoubikvitinace nebo polyubikvitinový řetězec na lyzinu 63 (K63) vedou k procesům nezávislým na proteasomu a hrají důležitou roli při endocytóze (Mukhopadhyay and Riezman, 2007).

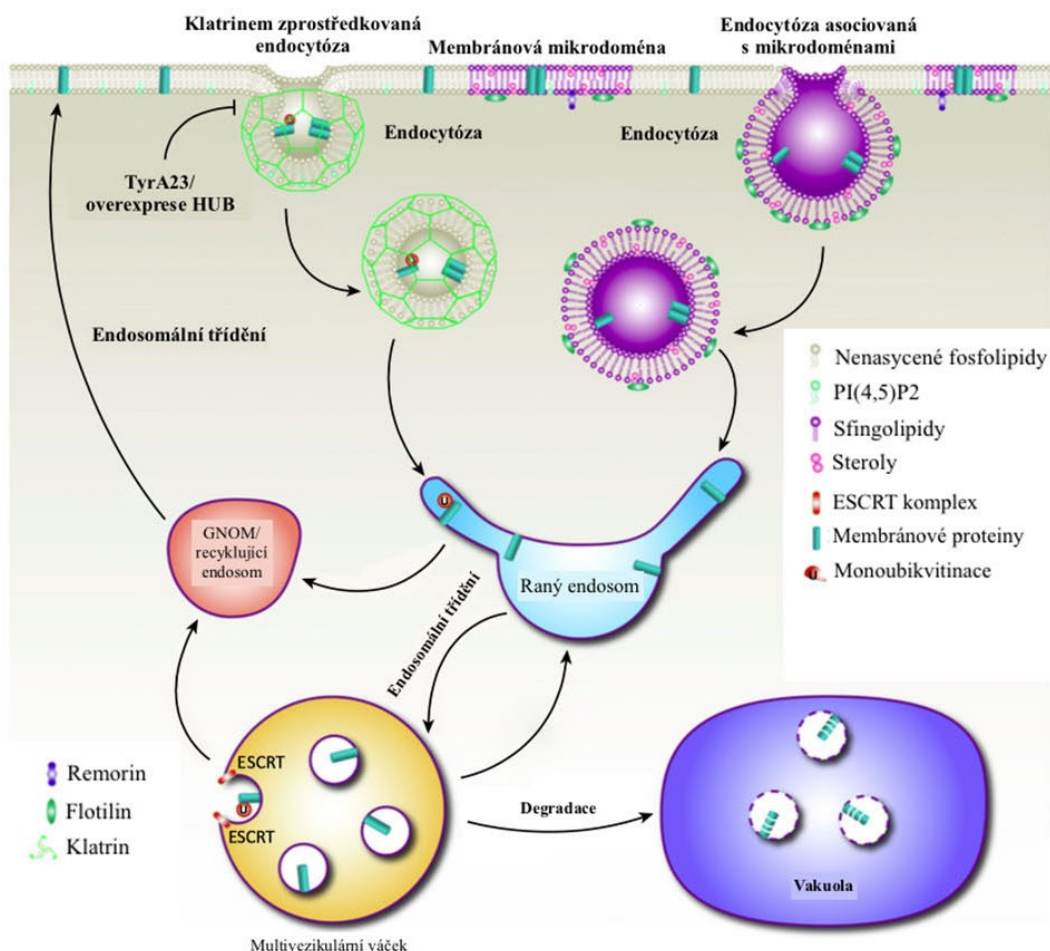
2.3.4.2. Ubikvitinem zprostředkovaná endocytóza

V rostlinné buňce jsou (multi)monoubikvitinace (Barberon et al., 2011; Roberts et al., 2011) a/nebo polyubikvitinový řetězec na K63 (Martins et al., 2015) dostatečným signálem pro internalizaci proteinů cestou CME a/nebo pro jejich endosomální třídění (viz Obrázek 4; Dubeaux and Vert, 2017; Scheuring et al., 2012), není to však vždy nutností. U některých membránových proteinů ubiquitinace podněcuje endosomální třídění pomocí ESCRT

komplexu (ESCRT – endosomal sorting complex required for transport) a jejich degradaci ve vakuole (Kasai et al., 2011). Pro více podrobností o endosomálním třídění a ESCRT mašinérii doporučuji souhrnnou práci, která se této problematice věnuje více do hloubky (Nagel et al., 2017).

2.3.5. Další regulace CME

Mezi další možné regulace CME patří gravitace (Kleine-Vehn et al., 2010) a nízká teplota, která působí sníženou expresí CHC1 a CHC2 genů (Zeng et al., 2013). Dále osmotický stres, který má vliv na rovnováhu mezi endocytózou a exocytózou. V hyperosmotickém prostředí dochází ke zvýšení CME a poklesu exocytózy, kdežto v hypoosmotickém prostředí je efekt opačný (Zwiewka et al., 2015).



Obrázek 4 – Osudy pohlcených membránových proteinů. Po internalizaci splývají s EE, kde dojde k jejich třídění. Některé proteiny jsou recyklovány zpět na PM. Proteiny, které byly monoubikvitinovány, jsou dále rozpoznány ESCRT komplexem a směřovány do intraluminálních váčků (ILVs – intraluminal vesicles) a případně dále transportovány do vakuoly k degradaci. CME může být inhibována TyrA23/overexpresí HUB (což je linie *At* s dominantně negativními CHC1) Upraveno dle (Fan et al., 2015)

3. Endocytóza nezávislá na klatrinu

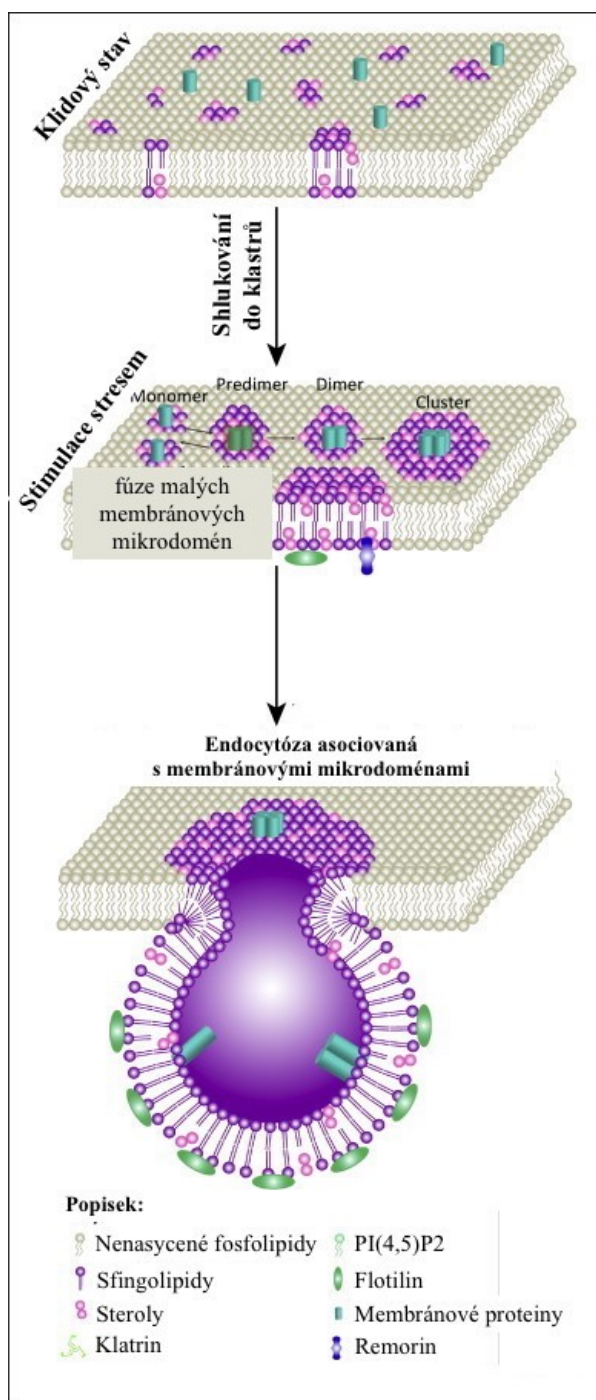
3.1. Fluid-phase endocytóza

Jednou z CIE u rostlin je takzvaná fluid-phase endocytóza (FPE). Nejčastěji se vyskytuje u buněk se zásobní funkcí. Asimiláty – například glukózu – přijímá buňka za nižších koncentrací pomocí přenašečů v plazmatické membráně a v cytosolu jsou cukry dále metabolizovány. Při vzrůstu koncentrace glukózy v extracelulárním prostředí dochází ke stimulaci fluid-phase endocytózy, která způsobí nespecifické pohlcení nadbytečných asimilátů do endocytického váčku, který se odštěpí od plazmatické membrány a přes TGN přesune svůj obsah do vakuoly, která slouží pro skladování zásobních látek (Ettxeberria et al., 2013). Endocytované váčky jsou poměrně velké, o průměru 1-7 μm (Ettxeberria et al., 2009). Molekulární aparát FPE prozatím nebyl identifikován a popsán, avšak s velkou pravděpodobností jde o fyziologicky důležitý mechanismus pro příjem živin v rostlinné buňce (Bandmann and Homann, 2012). Nedávno bylo popsáno, že nízká extracelulární koncentrace vápníku (Ca^{2+}) měla vliv na kořenové buňky v *At*. Způsobuje nárůst nespecifické FPE, kterou doprovázela i razantní změna v kompozici lipidů PM. Následně pohlcený materiál putuje konzervovanou endocytickou drahou přes TGN a další buněčné kompartmenty až do vakuoly. Vápník je tedy důležitý pro stabilizaci PM a pro selektivitu kořenů. Při snížené koncentraci vápníku v půdě se také rostliny stávají náchylnější vůči různým stresům. Bylo by však ještě potřeba provést studie, které by potvrdily spojitost mezi těmito dvěma vlivy vápníku (Zhang et al., 2018).

3.2. Endocytóza spojená s membránovými mikrodomény

Plazmatická membrána je struktura, která obklopuje celou buňku. Je důležitou složkou pro komunikaci s okolím buňky. Její složení je neuniformní a dynamické jak díky její fluiditě, tak i díky mechanismům, které regulují její lipidické a proteinové složení. Na povrchu buňky se proto mohou tvořit různé oblasti lišící se svým složením, strukturou a funkcí od svého okolí – dnes známé pod názvem mikrodomény (Jarsch et al., 2014). Membránové mikrodomény jsou obohaceny o steroly a sfingolipidy (viz Obrázek 5). V těchto oblastech byly pozorovány dva proteiny, které asociují s mikrodomény – flotilin 1 (Li et al., 2012) a remorin (Raffaele et al., 2009). U flotilinu byl zaznamenán podíl na CIE (Fan et al., 2015). V membráně navíc často dochází ke shlukování proteinů do klastrů, které pak mohou být asociovány se specifickými funkcemi a vlastnostmi (Hartman and Groves, 2011). Dimerizace či oligomerizace ovlivňuje

funkci některých proteinů. Některé proteiny také vyžadují pro své správné fungování specifické složení membrány ve svém okolí (Martens et al., 2004). Je tomu tak například u molekul receptoru amoniaku (AMT1), které při vysokých koncentracích extracelulárního amoniaku klastrují do mikrodomén a podléhají internalizaci, aby nedošlo k otravě buňky amoniakem (Wang et al., 2013b). Pro popis dalších proteinů účastnících se CIE a pro detailnější popis celého děje jsou ale nutné ještě další studie.



Obrázek 5 – Klastrování proteinů a jejich pohlcení buňkou pomocí CIE.
Upraveno dle (Fan et al., 2015)

4. Závěr

Výsledky studií ukazují, že endocytóza je pro rostliny důležitým procesem, díky kterému mohou pohlcovat membránové lipidy a proteiny, a tím regulovat složení PM. To dovoluje rostlině reagovat na signály z prostředí. Také je to cesta pro příjem živin a extracelulárních látek. U živočišných buněk jsou tyto procesy již značně probádané, bylo popsáno více než 50 proteinů a lipidů, které se podílejí jen na nejprobádanějším typu endocytózy, a to CME. Zato porozumění rostlinné endocytóze, jejím typům a jejich dílčím krokům stále zaostává. Také u rostlin je nejprobádanějším typem endocytózy CME, a přestože v jejím studiu byly za poslední roky byly udělány velké posuny, stále visí ve vzduchu mnoho otazníků.

Ve své práci jsem se pokusila tyto doposud nasbírané poznatky shrnout a nastítnit, jaká jsou v těchto endocytických procesech rostlinná specifika – jako například TPC, který je adaptorovým proteinovým komplexem. Má důležitou roli v rané fázi CME a byl objevený a studovaný během posledních několika let. Zůstává však stále otázkou, jak je celý proces CME v rostlinách regulován. Je nutné identifikovat další účastníky (např. které proteiny rozebírají klatrinový obal), a naopak objasnit funkci některých rostlině specifických proteinů (např. ARFB), aby se lépe porozumělo CME.

Závěrečnou část práce jsem věnovala typům CIE v rostlinné buňce, což je celé velké neprobádané pole vzhledem ke kusým informacím, které o CIE, její regulaci a podílejících se proteinech máme.

Vzhledem k významu rostlin pro lidstvo je důležité se věnovat a porozumět rostlinným procesům a jejich vlivu na životaschopnost rostlin.

5. Dodatky

5.1. Další obalené váčky v rostlinné buňce

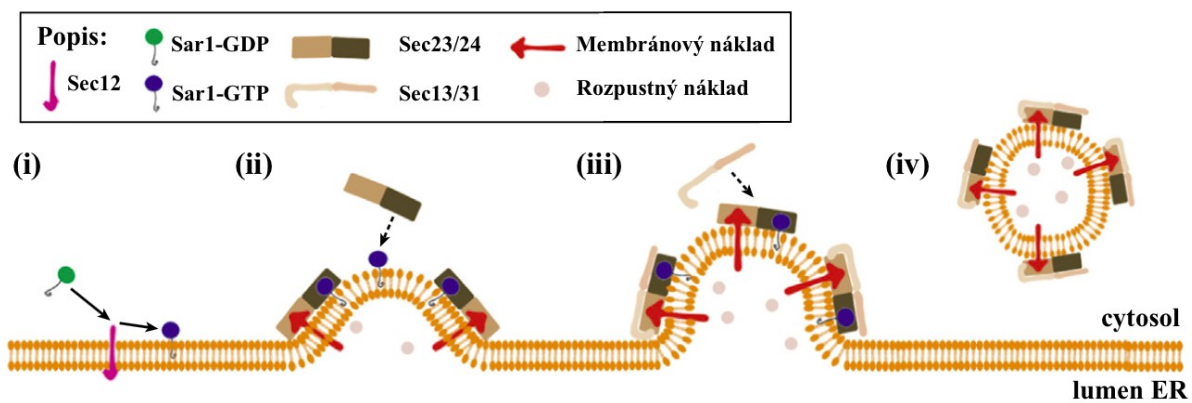
Pro úplnost v krátkosti popíši postupy tvorby dalších typů obalených váček COPI a COPII, které se ale nepodílejí na endocytóze. Účastní se však endosomálního transportu, proto považují za důležité je zmínit. COPI a COPII váčky se tvoří na endosomálních kompartmentech, ne však na PM, jak je tomu u CME. Umožňují raný sekreční transport nákladu mezi endoplasmatickým retikulem (ER – endoplasmatic reticulum) a Golgiho aparátem či v rámci něho. Jejich obal není tvořen klatrinem a na jejich tvorbě se podílí jiný molekulární aparát.

5.1.1. COPI váčky

COPI (coat protein complex I – obalový proteinový komplex I) váčky mají na starosti retrográdní transport proteinů z Golgiho aparátu do ER a také transport v rámci Golgiho aparátu. COPI je heptamerickým komplexem. Jeho 7 podjednotek se *en bloc* připojuje na membránu Golgiho aparátu, kam jsou rekrutovány pomocí Arf1 GTPázy. V tom místě pak vzniká COPI váček. COPI komplex je stěžejní pro udržování specifického proteinového složení daného prostoru organely, údržbu Golgiho aparátu a pro buněčný růst (Ahn et al., 2015).

5.1.2. COPII váčky

COPII (coat protein complex II) váčky zprostředkovávají anterográdní transport váčku z ER do Golgiho aparátu. Jedná se o raně sekretorickou dráhu. Pro vznik COPII váčku je zapotřebí minimálně několika cytosolických proteinů a Sec12. Protein Sec12 je GEF, který je přítomen v membráně ER, kde (i) aktivuje GTPázu Sar1 (Secretion-associated Ras-related protein 1). Výměnou GDP za GTP se Sar1 aktivuje a připojí na membránu ER. Následně (ii) rekrutuje z cytosolické strany membrány Sec23-24, proteiny vnitřní části obalu. Začne docházet k výběru nákladu pro pučící váček. Následuje (iii) připojení Sec13-31 komplexu, který tvoří vnější vrstvu obalu vznikajícího COPII váčku. Sec13-31 zároveň stimuluje GTPázu aktivující protein (GAP) Sec23. Ten svou aktivitou působí na Sar1, spustí jeho GTPázovou aktivitu a dojde k hydrolýze GTP připojeného na Sar1. Tím je (iv) proces tvorby COPII váčku dokončen. (Chung et al., 2016).



Obrázek 6 – Model sestavování COPII váčku v kvasinkách a živočišných buňkách.
Upraveno dle (Chung et al., 2016)

6. Seznam použité literatury

- Adamowski, M., Narasimhan, M., Kania, U., Glanc, M., Jaeger, G. D., and Friml, J. (2018). A Functional Study of AUXILIN-LIKE1 and 2, Two Putative Clathrin Uncoating Factors in Arabidopsis. *Plant Cell* 30, 700–716. doi:10.1105/tpc.17.00785.
- Ahn, H.-K., Kang, Y. W., Lim, H. M., Hwang, I., and Pai, H.-S. (2015). Physiological Functions of the COPI Complex in Higher Plants. *Mol. Cells* 38, 866–875. doi:10.14348/molcells.2015.0115.
- An, C., and Mou, Z. (2011). Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 53, 412–428. doi:10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x.
- Antonny, B., Burd, C., Camilli, P. D., Chen, E., Daumke, O., Faelber, K., et al. (2016). Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J.* 35, 2270–2284. doi:10.15252/embj.201694613.
- Baisa, G. A., Mayers, J. R., and Bednarek, S. Y. (2013). Budding and braking news about clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 718–725. doi:10.1016/j.pbi.2013.09.005.
- Bandmann, V., and Homann, U. (2012). Clathrin-independent endocytosis contributes to uptake of glucose into BY-2 protoplasts. *Plant J.* 70, 578–584. doi:10.1111/j.1365-3113.2011.04892.x.
- Bar, M., Sharfman, M., and Avni, A. (2011). LeEix1 functions as a decoy receptor to attenuate LeEix2 signaling. *Plant Signal. Behav.* 6, 455–457. doi:10.4161/psb.6.3.14714.
- Bar, M., Sharfman, M., Schuster, S., and Avni, A. (2009). The Coiled-Coil Domain of EHD2 Mediates Inhibition of LeEix2 Endocytosis and Signaling. *PLoS ONE* 4, e7973. doi:10.1371/journal.pone.0007973.
- Barberon, M., Zelazny, E., Robert, S., Conéjéro, G., Curie, C., Friml, J., et al. (2011). Monoubiquitin-dependent endocytosis of the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E450–E458. doi:10.1073/pnas.1100659108.
- Bashline, L., Li, S., Anderson, C. T., Lei, L., and Gu, Y. (2013). The Endocytosis of Cellulose Synthase in Arabidopsis Is Dependent on μ 2, a Clathrin-Mediated Endocytosis Adaptin. *Plant Physiol.* 163, 150–160. doi:10.1104/pp.113.221234.
- Basu, D., Le, J., Zakharova, T., Mallery, E. L., and Szymanski, D. B. (2008). A SPIKE1 signaling complex controls actin-dependent cell morphogenesis through the heteromeric WAVE and ARP2/3 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 4044–4049.

doi:10.1073/pnas.0710294105.

Bednarek, S. Y., and Backues, S. K. (2010). Plant dynamin-related protein families DRP1 and DRP2 in plant development. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 797–806. doi:10.1042/BST0380797.

Bogdanov, M., Dowhan, W., and Vitrac, H. (2014). Lipids and topological rules governing membrane protein assembly. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 1475–1488. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.12.007.

Chen, X., Irani, N. G., and Friml, J. (2011). Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 674–682. doi:10.1016/j.pbi.2011.08.006.

Chen, X., Naramoto, S., Robert, S., Tejos, R., Löfke, C., Lin, D., et al. (2012). ABP1 and ROP6 GTPase Signaling Regulate Clathrin-Mediated Endocytosis in Arabidopsis Roots. *Curr. Biol.* 22, 1326–1332. doi:10.1016/j.cub.2012.05.020.

Chung, K. P., Zeng, Y., and Jiang, L. (2016). COPII Paralogs in Plants: Functional Redundancy or Diversity? *Trends Plant Sci.* 21, 758–769. doi:10.1016/j.tplants.2016.05.010.

Collings, D. A., Gebbie, L. K., Howles, P. A., Hurley, U. A., Birch, R. J., Cork, A. H., et al. (2008). Arabidopsis dynamin-like protein DRP1A: a null mutant with widespread defects in endocytosis, cellulose synthesis, cytokinesis, and cell expansion. *J. Exp. Bot.* 59, 361–376. doi:10.1093/jxb/erm324.

Cram W. J. (1980). Pinocytosis in plants. *New Phytol.* 84, 1–17. doi:10.1111/j.1469-8137.1980.tb00744.x.

Damme, D. V., Gadeyne, A., Vanstraelen, M., Inzé, D., Montagu, M. C. E. V., Jaeger, G. D., et al. (2011). Adaptin-like protein TPLATE and clathrin recruitment during plant somatic cytokinesis occurs via two distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 615–620. doi:10.1073/pnas.1017890108.

Dhonukshe, P., Grigoriev, I., Fischer, R., Tominaga, M., Robinson, D. G., Hašek, J., et al. (2008). Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 4489–4494. doi:10.1073/pnas.0711414105.

Donaldson, J. G., and Jackson, C. L. (2000). Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 475–482. doi:10.1016/S0955-0674(00)00119-8.

Du, Y., Tejos, R., Beck, M., Himschoot, E., Li, H., Robatzek, S., et al. (2013). Salicylic acid interferes with clathrin-mediated endocytic protein trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 7946–7951. doi:10.1073/pnas.1220205110.

Dubeaux, G., and Vert, G. (2017). Zooming into plant ubiquitin-mediated endocytosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 40, 56–62. doi:10.1016/j.pbi.2017.07.005.

Ebine, K., Fujimoto, M., Okatani, Y., Nishiyama, T., Goh, T., Ito, E., et al. (2011). A membrane

trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat. Cell Biol.* 13, 853–859. doi:10.1038/ncb2270.

Ettxeberria, E., Gonzalez, P., and Pozueta, J. (2009). Evidence for two endocytic transport pathways in plant cells. *Plant Sci.* 177, 341–348. doi:10.1016/j.plantsci.2009.06.014.

Ettxeberria, E., Gonzalez, P., and Pozueta-Romero, J. (2013). Architectural remodeling of the tonoplast during fluid-phase endocytosis. *Plant Signal. Behav.* 8, e24793. doi:10.4161/psb.24793.

Fan, L., Li, R., Pan, J., Ding, Z., and Lin, J. (2015). Endocytosis and its regulation in plants. *Trends Plant Sci.* 20, 388–397. doi:10.1016/j.tplants.2015.03.014.

Ferreira, A. P. A., and Boucrot, E. (2018). Mechanisms of Carrier Formation during Clathrin-Independent Endocytosis. *Trends Cell Biol.* 28, 188–200. doi:10.1016/j.tcb.2017.11.004.

Fujimoto, M., Arimura, S., Ueda, T., Takanashi, H., Hayashi, Y., Nakano, A., et al. (2010). Arabidopsis dynamin-related proteins DRP2B and DRP1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 6094–6099. doi:10.1073/pnas.0913562107.

Fujimoto, M., and Tsutsumi, N. (2014). Dynamin-related proteins in plant post-Golgi traffic. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00408.

Fujimoto, M., and Ueda, T. (2012). Conserved and Plant-Unique Mechanisms Regulating Plant Post-Golgi Traffic. *Front. Plant Sci.* 3. doi:10.3389/fpls.2012.00197.

Gadeyne, A., Sánchez-Rodríguez, C., Vanneste, S., Di Rubbo, S., Zaubert, H., Vanneste, K., et al. (2014). The TPLATE Adaptor Complex Drives Clathrin-Mediated Endocytosis in Plants. *Cell* 156, 691–704. doi:10.1016/j.cell.2014.01.039.

Han, X., Shi, Y., Liu, G., Guo, Y., and Yang, Y. (2018). Activation of ROP6 GTPase by Phosphatidylglycerol in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 9. doi:10.3389/fpls.2018.00347.

Hartman, N. C., and Groves, J. T. (2011). Signaling clusters in the cell membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 370–376. doi:10.1016/j.ceb.2011.05.003.

Henne, W. M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., et al. (2010). FCHo Proteins Are Nucleators of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Science* 328, 1281–1284. doi:10.1126/science.1188462.

Hinshaw, J. E., and Schmid, S. L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374, 190–192. doi:10.1038/374190a0.

Hirst, J., Barlow, L. D., Francisco, G. C., Sahlender, D. A., Seaman, M. N. J., Dacks, J. B., et al. (2011). The Fifth Adaptor Protein Complex. *PLOS Biol.* 9, e1001170. doi:10.1371/journal.pbio.1001170.

Hirst, J., Schlacht, A., Norcott, J. P., Traynor, D., Bloomfield, G., Antrobus, R., et al. Characterization of TSET, an ancient and widespread membrane trafficking complex. *eLife* 3. doi:10.7554/eLife.02866.

Hong, Z., Bednarek, S. Y., Blumwald, E., Hwang, I., Jurgens, G., Menzel, D., et al. (2003). A unified nomenclature for Arabidopsis dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. *Plant Mol. Biol.* 53, 261–265. doi:10.1023/B:PLAN.00000007000.29697.81.

Huang, J., Fujimoto, M., Fujiwara, M., Fukao, Y., Arimura, S., and Tsutsumi, N. (2015). Arabidopsis dynamin-related proteins, DRP2A and DRP2B, function coordinately in post-Golgi trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 238–244. doi:10.1016/j.bbrc.2014.11.065.

Ischebeck, T., Werner, S., Krishnamoorthy, P., Lerche, J., Meijón, M., Stenzel, I., et al. (2013). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Influences PIN Polarization by Controlling Clathrin-Mediated Membrane Trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell*, tpc.113.116582. doi:10.1105/tpc.113.116582.

Jarsch, I. K., Konrad, S. S. A., Stratil, T. F., Urbanus, S. L., Szymanski, W., Braun, P., et al. (2014). Plasma Membranes Are Subcompartmentalized into a Plethora of Coexisting and Diverse Microdomains in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana*[C][W]. *Plant Cell* 26, 1698–1711. doi:10.1105/tpc.114.124446.

Kaksonen, M., and Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* doi:10.1038/nrm.2017.132.

Kasai, K., Takano, J., Miwa, K., Toyoda, A., and Fujiwara, T. (2011). High Boron-induced Ubiquitination Regulates Vacuolar Sorting of the BOR1 Borate Transporter in Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* 286, 6175–6183. doi:10.1074/jbc.M110.184929.

Kelly, B. T., Graham, S. C., Liska, N., Dannhauser, P. N., Höning, S., Ungewickell, E. J., et al. (2014). AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science* 345, 459–463. doi:10.1126/science.1254836.

Kim, S. Y., Xu, Z.-Y., Song, K., Kim, D. H., Kang, H., Reichardt, I., et al. (2013). Adaptor Protein Complex 2-Mediated Endocytosis Is Crucial for Male Reproductive Organ Development in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 2970–2985. doi:10.1105/tpc.113.114264.

Kirchhausen, T. (2000). Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 699–727. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.699.

Kirchhausen, T., Owen, D., and Harrison, S. C. (2014). Molecular Structure, Function, and Dynamics of Clathrin-Mediated Membrane Traffic. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016725. doi:10.1101/cshperspect.a016725.

- Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A. R., Tasaka, M., Morita, M. T., and Friml, J. (2010). Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 22344–22349. doi:10.1073/pnas.1013145107.
- Konopka, C. A., and Bednarek, S. Y. (2008). Comparison of the Dynamics and Functional Redundancy of the Arabidopsis Dynamin-Related Isoforms DRP1A and DRP1C during Plant Development. *Plant Physiol.* 147, 1590–1602. doi:10.1104/pp.108.116863.
- Lam, B. C.-H., Sage, T. L., Bianchi, F., and Blumwald, E. (2001). Role of SH3 Domain-Containing Proteins in Clathrin-Mediated Vesicle Trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 2499–2512. doi:10.1105/tpc.010279.
- Larson, E. R., Zelm, E. V., Roux, C., Marion-Poll, A., and Blatt, M. R. (2017). Clathrin Heavy Chain Subunits Coordinate Endo- and Exocytic Traffic and Affect Stomatal Movement. *Plant Physiol.* 175, 708–720. doi:10.1104/pp.17.00970.
- Lee, M. H., and Hwang, I. (2014). Adaptor proteins in protein trafficking between endomembrane compartments in plants. *J. Plant Biol.* 57, 265–273. doi:10.1007/s12374-014-0314-8.
- Lemmon, M. A., and Ferguson, K. M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.* 350, 1–18. doi:10.1042/bj3500001.
- Li, R., Liu, P., Wan, Y., Chen, T., Wang, Q., Mettbach, U., et al. (2012). A Membrane Microdomain-Associated Protein, Arabidopsis Flot1, Is Involved in a Clathrin-Independent Endocytic Pathway and Is Required for Seedling Development. *Plant Cell* 24, 2105–2122. doi:10.1105/tpc.112.095695.
- Lin, D., Nagawa, S., Chen, J., Cao, L., Chen, X., Xu, T., et al. (2012). A ROP GTPase-Dependent Auxin Signaling Pathway Regulates the Subcellular Distribution of PIN2 in Arabidopsis Roots. *Curr. Biol.* 22, 1319–1325. doi:10.1016/j.cub.2012.05.019.
- Liu, J., Sun, Y., Drubin, D. G., and Oster, G. F. (2009). The Mechanochemistry of Endocytosis. *PLOS Biol.* 7, e1000204. doi:10.1371/journal.pbio.1000204.
- Marhavý, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., et al. (2011). Cytokinin Modulates Endocytic Trafficking of PIN1 Auxin Efflux Carrier to Control Plant Organogenesis. *Dev. Cell* 21, 796–804. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.014.
- Marhavý, P., Duclercq, J., Weller, B., Feraru, E., Bielach, A., Offringa, R., et al. (2014). Cytokinin Controls Polarity of PIN1-Dependent Auxin Transport during Lateral Root Organogenesis. *Curr. Biol.* 24, 1031–1037. doi:10.1016/j.cub.2014.04.002.
- Martens, J. R., O'Connell, K., and Tamkun, M. (2004). Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 16–21.

doi:10.1016/j.tips.2003.11.007.

Martins, S., Dohmann, E. M. N., Cayrel, A., Johnson, A., Fischer, W., Pojer, F., et al. (2015). Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nat. Commun.* 6, 6151. doi:10.1038/ncomms7151.

Mayinger, P. (2012). Phosphoinositides and vesicular membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 1104–1113. doi:10.1016/j.bbalip.2012.01.002.

McMahon, H. T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 517–533. doi:10.1038/nrm3151.

Men, S., Boutté, Y., Ikeda, Y., Li, X., Palme, K., Stierhof, Y.-D., et al. (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat. Cell Biol.* 10, 237–244. doi:10.1038/ncb1686.

Molendijk, A. J., Ruperti, B., and Palme, K. (2004). Small GTPases in vesicle trafficking. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 694–700. doi:10.1016/j.pbi.2004.09.014.

Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007). Proteasome-Independent Functions of Ubiquitin in Endocytosis and Signaling. *Science* 315, 201–205. doi:10.1126/science.1127085.

Nagawa, S., Xu, T., Lin, D., Dhonukshe, P., Zhang, X., Friml, J., et al. (2012). ROP GTPase-Dependent Actin Microfilaments Promote PIN1 Polarization by Localized Inhibition of Clathrin-Dependent Endocytosis. *PLOS Biol.* 10, e1001299. doi:10.1371/journal.pbio.1001299.

Nagel, M.-K., Kalinowska, K., Vogel, K., Reynolds, G. D., Wu, Z., Anzenberger, F., et al. (2017). Arabidopsis SH3P2 is an ubiquitin-binding protein that functions together with ESCRT-I and the deubiquitylating enzyme AMSH3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E7197–E7204. doi:10.1073/pnas.1710866114.

Naramoto, S., Kleine-Vehn, J., Robert, S., Fujimoto, M., Dainobu, T., Paciorek, T., et al. (2010). ADP-ribosylation factor machinery mediates endocytosis in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 21890–21895. doi:10.1073/pnas.1016260107.

Naramoto, S., Otegui, M. S., Kutsuna, N., Rycke, R. de, Dainobu, T., Karampelias, M., et al. (2014). Insights into the Localization and Function of the Membrane Trafficking Regulator GNOM ARF-GEF at the Golgi Apparatus in Arabidopsis. *Plant Cell* 26, 3062–3076. doi:10.1105/tpc.114.125880.

Nielsen, M., Albrethsen, J., Larsen, F. H., and Skriver, K. (2006). The Arabidopsis ADP-ribosylation factor (ARF) and ARF-like (ARL) system and its regulation by BIG2, a large ARF-GEF. *Plant Sci.* 171, 707–717. doi:10.1016/j.plantsci.2006.07.002.

Niemann, H. H., Knetsch, M. L. W., Scherer, A., Manstein, D. J., and Kull, F. J. (2001). Crystal

structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms. *EMBO J.* 20, 5813–5821. doi:10.1093/emboj/20.21.5813.

Owen, D. J., and Evans, P. R. (1998). A Structural Explanation for the Recognition of Tyrosine-Based Endocytotic Signals. *Science* 282, 1327–1332. doi:10.1126/science.282.5392.1327.

Paciorek, T., Zažímalová, E., Ruthardt, N., Petrášek, J., Stierhof, Y.-D., Kleine-Vehn, J., et al. (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435, 1251–1256. doi:10.1038/nature03633.

Paez Valencia, J., Goodman, K., and Otegui, M. S. (2016). Endocytosis and Endosomal Trafficking in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 309–335. doi:10.1146/annurev-arplant-043015-112242.

Pan, J., Fujioka, S., Peng, J., Chen, J., Li, G., and Chen, R. (2009). The E3 Ubiquitin Ligase SCFTIR1/AFB and Membrane Sterols Play Key Roles in Auxin Regulation of Endocytosis, Recycling, and Plasma Membrane Accumulation of the Auxin Efflux Transporter PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21, 568–580. doi:10.1105/tpc.108.061465.

Pandya-Kumar, N., Shema, R., Kumar, M., Mayzlish-Gati, E., Levy, D., Zemach, H., et al. (2014). Strigolactone analog GR24 triggers changes in PIN2 polarity, vesicle trafficking and actin filament architecture. *New Phytol.* 202, 1184–1196. doi:10.1111/nph.12744.

Pickart, C. M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J.* 11, 1055–1066. doi:10.1096/fasebj.11.13.9367341.

Pickart, C. M., and Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1695, 55–72. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.019.

Praefcke, G. J. K., and McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 133–147. doi:10.1038/nrm1313.

Raffaele, S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., Retana, S. G., Boubekur, T., et al. (2009). Remorin, a Solanaceae Protein Resident in Membrane Rafts and Plasmodesmata, Impairs Potato virus X Movement. *Plant Cell* 21, 1541–1555. doi:10.1105/tpc.108.064279.

Reuff, M., Mikosch, M., and Homann, U. (2010). Trafficking, lateral mobility and segregation of the plant K⁺ channel KAT1*. *Plant Biol.* 12, 99–104. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00355.x.

Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., et al. (2010). ABP1 Mediates Auxin Inhibition of Clathrin-Dependent Endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* 143, 111–121. doi:10.1016/j.cell.2010.09.027.

Roberts, D., Pedmale, U. V., Morrow, J., Sachdev, S., Lechner, E., Tang, X., et al. (2011). Modulation of Phototropic Responsiveness in *Arabidopsis* through Ubiquitination of

Phototropin 1 by the CUL3-Ring E3 Ubiquitin Ligase CRL3NPH3. *Plant Cell* 23, 3627–3640. doi:10.1105/tpc.111.087999.

Robinson, D. G., and Milliner, S. (1990). Endocytosis in plants. *Physiol. Plant.* 79, 96–104. doi:10.1111/j.1399-3054.1990.tb05871.x.

Rodman, J. S., and Wandinger-Ness, A. (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* 113, 183–192.

Rubbo, S. D., Irani, N. G., Kim, S. Y., Xu, Z.-Y., Gadeyne, A., Dejonghe, W., et al. (2013). The Clathrin Adaptor Complex AP-2 Mediates Endocytosis of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 2986–2997. doi:10.1105/tpc.113.114058.

Sauer, M., and Kleine-Vehn, J. (2011). AUXIN BINDING PROTEIN1: The Outsider. *Plant Cell* 23, 2033–2043. doi:10.1105/tpc.111.087064.

Scheuring, D., Künzl, F., Viotti, C., Yan, M. S., Jiang, L., Schellmann, S., et al. (2012). Ubiquitin initiates sorting of Golgi and plasma membrane proteins into the vacuolar degradation pathway. *BMC Plant Biol.* 12, 164. doi:10.1186/1471-2229-12-164.

Shinohara, N., Taylor, C., and Leyser, O. (2013). Strigolactone Can Promote or Inhibit Shoot Branching by Triggering Rapid Depletion of the Auxin Efflux Protein PIN1 from the Plasma Membrane. *PLOS Biol.* 11, e1001474. doi:10.1371/journal.pbio.1001474.

Shpetner, H. S., and Vallee, R. B. (1989). Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 59, 421–432. doi:10.1016/0092-8674(89)90027-5.

Simon, M. L. A., Platre, M. P., Assil, S., Wijk, R. van, Chen, W. Y., Chory, J., et al. (2013). A multi-colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in Arabidopsis. *Plant J.* 77, 322–337. doi:10.1111/tpj.12358.

Singh, M. K., and Jürgens, G. (2018). Specificity of plant membrane trafficking – ARFs, regulators and coat proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 80, 85–93. doi:10.1016/j.semcdb.2017.10.005.

Sorek, N., Segev, O., Gutman, O., Bar, E., Richter, S., Poraty, L., et al. (2010). An S-Acylation Switch of Conserved G Domain Cysteines Is Required for Polarity Signaling by ROP GTPases. *Curr. Biol.* 20, 914–920. doi:10.1016/j.cub.2010.03.057.

Sutter, J.-U., Sieben, C., Hartel, A., Eisenach, C., Thiel, G., and Blatt, M. R. (2007). Abscissic Acid Triggers the Endocytosis of the Arabidopsis KAT1 K⁺ Channel and Its Recycling to the Plasma Membrane. *Curr. Biol.* 17, 1396–1402. doi:10.1016/j.cub.2007.07.020.

Sweitzer, S. M., and Hinshaw, J. E. (1998). Dynamin Undergoes a GTP-Dependent Conformational Change Causing Vesiculation. *Cell* 93, 1021–1029. doi:10.1016/S0092-

8674(00)81207-6.

Taylor, N. G. (2011). A role for Arabidopsis dynamin related proteins DRP2A/B in endocytosis; DRP2 function is essential for plant growth. *Plant Mol. Biol.* 76, 117–129. doi:10.1007/s11103-011-9773-1.

Traub, L. M., and Bonifacino, J. S. (2013). Cargo Recognition in Clathrin-Mediated Endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a016790. doi:10.1101/cshperspect.a016790.

Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., and Nakano, A. (2001). Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of Arabidopsis thaliana. *EMBO J.* 20, 4730–4741. doi:10.1093/emboj/20.17.4730.

Uemura, T., and Ueda, T. (2014). Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22, 116–121. doi:10.1016/j.pbi.2014.10.002.

Vierstra, R. D. (2009). The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 385–397. doi:10.1038/nrm2688.

Wang, C., Yan, X., Chen, Q., Jiang, N., Fu, W., Ma, B., et al. (2013a). Clathrin Light Chains Regulate Clathrin-Mediated Trafficking, Auxin Signaling, and Development in Arabidopsis[C][W][OA]. *Plant Cell* 25, 499–516. doi:10.1105/tpc.112.108373.

Wang, Q., Zhao, Y., Luo, W., Li, R., He, Q., Fang, X., et al. (2013b). Single-particle analysis reveals shutoff control of the Arabidopsis ammonium transporter AMT1;3 by clustering and internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 13204–13209. doi:10.1073/pnas.1301160110.

Werlen, G., and Palmer, E. (2002). The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 299–305. doi:10.1016/S0952-7915(02)00339-4.

Wilbur, J. D., Hwang, P. K., Ybe, J. A., Lane, M., Sellers, B. D., Jacobson, M. P., et al. (2010). Conformation Switching of Clathrin Light Chain Regulates Clathrin Lattice Assembly. *Dev. Cell* 18, 854–861. doi:10.1016/j.devcel.2010.04.007.

Ybe, J. A., Perez-Miller, S., Niu, Q., Coates, D. A., Drazer, M. W., and Clegg, M. E. (2007). Light Chain C-Terminal Region Reinforces the Stability of Clathrin Heavy Chain Trimers. *Traffic* 8, 1101–1110. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00597.x.

Yorimitsu, T., Sato, K., and Takeuchi, M. (2014). Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00411.

Zeng, M.-H., Liu, S.-H., Yang, M.-X., Zhang, Y.-J., Liang, J.-Y., Wan, X.-R., et al. (2013). Characterization of a Gene Encoding Clathrin Heavy Chain in Maize Up-Regulated by Salicylic Acid, Absciscic Acid and High Boron Supply. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 15179–15198. doi:10.3390/ijms140715179.

- Zhang, T., Yang, J., Sun, Y., Kang, Y., Yang, J., and Qi, Z. (2018). Calcium deprivation enhances non-selective fluid-phase endocytosis and modifies membrane lipid profiles in *Arabidopsis* roots. *J. Plant Physiol.* 226, 22–30. doi:10.1016/j.jplph.2018.04.002.
- Zhang, Y., Persson, S., Hirst, J., Robinson, M. S., van Damme, D., and Sánchez-Rodríguez, C. (2015). Change your Tplate, change your fate: plant CME and beyond. *Trends Plant Sci.* 20, 41–48. doi:10.1016/j.tplants.2014.09.002.
- Zhao, Y., Yan, A., Feijo, J., Furutani, M., Takenawa, T., Hwang, I., et al. (2010). Phosphoinositides Regulate Clathrin-Dependent Endocytosis at the Tip of Pollen Tubes in *Arabidopsis* and Tobacco. *Plant Cell*, tpc.110.076760. doi:10.1105/tpc.110.076760.
- Zouhar, J., and Sauer, M. (2014). Helping Hands for Budding Prospects: ENTH/ANTH/VHS Accessory Proteins in Endocytosis, Vacuolar Transport, and Secretion. *Plant Cell* 26, 4232–4244. doi:10.1105/tpc.114.131680.
- Zwiewka, M., Nodzyński, T., Robert, S., Vanneste, S., and Friml, J. (2015). Osmotic Stress Modulates the Balance between Exocytosis and Clathrin-Mediated Endocytosis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 8, 1175–1187. doi:10.1016/j.molp.2015.03.007.